

**Induktion zystischer Ovarfollikel beim Rind durch
intrafollikuläre Injektion von Cyclooxygenase-Inhibitoren**

von Rebecca Svenja Marie Lapp

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

**Induktion zystischer Ovarfollikel beim Rind durch
intrafollikuläre Injektion von Cyclooxygenase-Inhibitoren**

von Rebecca Svenja Marie Lapp

aus Wuppertal

München 2020

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Lehrstuhl für Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Arbeit angefertigt unter der Leitung von:
Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe

Angefertigt am:
Leibniz-Institut für Nutztierbiologie (FBN) in Dummerstorf
Institut für Fortpflanzungsbiologie

Mentoren:
PD Dr. rer. nat. Joachim Weitzel
Dr. med. vet. Andreas Vernunft

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof Dr. Holm Zerbe

Korreferent: Priv.-Doz. Dr. Florian M. Trefz

Tag der Promotion: 25. Juli 2020

Für Perle und Moni

INHALTSVERZEICHNIS

I.	EINLEITUNG.....	1
II.	LITERATURÜBERSICHT	3
1.	Physiologie des ovariellen Zyklus.....	3
1.1.	Ovulation	5
1.2.	Gelbkörperfunktion.....	6
2.	Cyclooxygenase-System.....	8
2.1.	Cyclooxygenase-Subtypen	8
2.2.	Cyclooxygenase-Expression am Ovar	10
2.3.	Prostaglandine.....	12
2.4.	Einfluss der Prostaglandine auf die Ovulation	13
2.5.	Einfluss der Prostaglandine auf die Gelbkörperfunktion.....	15
3.	Zystische Ovarfollikel.....	17
3.1.	Vorkommen zystischer Ovarfollikel.....	17
3.2.	Definition zystischer Ovarfollikel	18
3.3.	Klassifizierung zystischer Ovarfollikel	20
3.4.	Pathogenese zystischer Ovarfollikel	23
4.	Modelle zur Induktion zystischer Ovarfollikel	28
4.1.	Bedarf und Anforderung eines Tier-Modells	28
4.2.	Modelle zur systemischen Induktion zystischer Ovarfollikel	29
4.3.	Modelle zur lokalen Induktion zystischer Ovarfollikel	35
III.	INDUCTION OF CYSTIC OVARIAN FOLLICLES (COFS) IN CATTLE BY USING AN INTRAFOLLICULAR INJECTION OF INDOMETHACIN	41
IV.	DIFFERENTE WIRKUNG INTRAFOLLIKULÄR ANGEWANDTER CYCLOOXYGENASE-INHIBITOREN AUF BOVINE PRÄOVULATORISCHE FOLLIKELE.....	51
1.	Hintergrund und Fragestellung.....	51
2.	Material und Methoden	53
2.1.	Versuchstiere	53
2.2.	Auswahl, Untersuchung und Injektion der präovulatorischen Follikel	53

2.3.	Applikation von unspezifischen und spezifischen COX-Inhibitoren und Kontrolllösungen	53
2.4.	Klinische Untersuchung.....	54
2.5.	PGE ₂ -Bestimmung im präovulatorischen Follikel	55
2.6.	Statistische Auswertung.....	55
3.	Ergebnisse.....	55
3.1.	Effekte der injizierten Substanzen	55
3.2.	Senkung der PGE ₂ -Konzentration im präovulatorischen Follikel.....	57
V.	ÜBERGREIFENDE DISKUSSION.....	59
1.	Klinische Effekte der induzierten zystischen Ovarfollikel	60
1.1.	Fortbestehendes Wachstum durch LH-Signal	60
1.2.	Fortbestehende Östradiol-Synthese	62
1.3.	Luteinisierungsvorgänge	65
1.4.	Bildung suprabasaler Progesteron-Werte	66
1.5.	Zyklusverlängerung	68
2.	Etablierungsschritte des erarbeiteten Modells	69
2.1.	Anpassung des Injektionszeitpunktes	69
2.2.	COX-Inhibitoren und deren dosisabhängige Wirkung	69
3.	Biochemische Auswirkungen der eingesetzten Cyclooxygenase-Inhibitoren im Follikel	72
3.1.	Senkung der Prostaglandin-Synthese im präovulatorischen Follikel	72
3.2.	Modulation intrafollikulärer proteolytischer Enzyme durch COX-Inhibitoren?	73
3.3.	Modulation der intrafollikulären Thromboxan-Synthese und der Lipoxxygenase durch COX-Inhibitoren?	75
4.	Fazit zum Einsatz von Cyclooxygenase-Inhibitoren zur Induktion zystischer Ovarfollikel.....	76
5.	Schlussfolgerung und Ausblick	77
VI.	ZUSAMMENFASSUNG	79
VII.	SUMMARY	83
VIII.	LITERATURVERZEICHNIS	87
IX.	DANKSAGUNG	103

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

15-HETE	15-Hydroxyeicosatetraensäure
3 β -HSD	3 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
ACE	Angiotensin konvertierendes Enzym
ACTH	Adenocorticotropes Hormon
Ang-II	Angiotensin-II
BAX	BCL 2 assoziiertes X Protein
BCL 2	B-Cell Lymphom 2
BMP	Knochenmorphogenetische Proteine
COX	Cyclooxygenase
DBI	Diazepam Bindungs-Inhibitor
ET-1	Endothelin-1
FALSG	Fas Ligand
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GDF-9	Wachstums-Differenzierungsfaktor 9
GnRH	Gonadotropin freisetzendes Hormon
hCG	humanes Choriongonadotropin
IGF-1	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor 1
IGFBP	Insulin ähnlicher Wachstumsfaktor bindendes Protein
IL-1	Interleukin 1
i.m.	intramuskulär
LH	Luteinisierendes Hormon
LPS	Lipopolysaccharide
LUF	Luteinisierende nicht ovulierte Follikel
MMP	Matrix-Metalloprotease

mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NSAID	nicht-steroidales Antiphlogistikum
oxLDL	oxidiertes Low-Density Lipoprotein
PG	Prostaglandin
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
s.c.	subcutan
StAR	Steroid akut Regulator
TGF	transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	Gewebshemmer der Metalloproteasen
TNF α	Tumornekrosefaktor α
tPA	Gewebe-Plasminogenaktivator
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
ZOF	Zystischer Ovarfollikel

I. EINLEITUNG

Die reproduktive Fitness stellt einen der wichtigsten ökonomischen Faktoren der Rinderhaltung dar. Jegliche Veränderungen, die zu einer eingeschränkten Fertilität führen, ziehen unweigerlich wirtschaftliche Verluste für die betroffenen Betriebe nach sich. So war im Jahr 2018 der häufigste genannte Abgangsgrund bei Milchkühen die Infertilität und lag laut dem Verein für „Vereinigte Informationssysteme Tierhaltung“ (www.vit.de) bei 18,4 % aller Abgangsursachen.

Obwohl die Ursachen für eine In- oder Subfertilität vielseitig sind, zählt die Bildung zystischer Ovarfollikel (ZOF) bei Milchkühen immer noch mit einer Inzidenz von 6-30 % zu einem wichtigen Auslöser (VANHOLDER et al., 2006).

Ogleich die erste Beschreibung von ZOF bei Rindern bereits 1831 erfolgte, ist bis heute die Pathogenese der ZOF-Entstehung nicht vollständig aufgeklärt (KESLER und GARVERICK, 1982; VANHOLDER et al., 2006).

Neben Erklärungsansätzen, die vor allem auf eine Störung der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen-Achse abzielen, ist zudem bekannt, dass ebenso lokale Faktoren am Ovar eine entscheidende Rolle spielen können.

Der Anstieg der Cyclooxygenase-Aktivität und die damit verbundene Steigerung der Gehalte an Prostaglandin E₂ (PGE₂) in der Follikelflüssigkeit stellen einen Schlüsselfaktor für eine physiologische Ovulation dar (SIROIS et al., 2004). Eine Störung in diesem System stellt eine mögliche Ursache der lokal im Ovar basierten ZOF-Entstehung dar.

Die besondere Problematik bei der Erforschung dieser Erkrankung liegt jedoch in der zumeist nur retrospektiv möglichen Betrachtung der ZOF-Entstehung. Ein schon bestehender ZOF kann zwar anhand seiner Morphologie und seiner biochemischen Zusammensetzung charakterisiert werden, aber das entscheidende Zeitfenster der Entstehung, bei dem es zu einem Umschwung von einem physiologischen zu einem pathologischen Zustand kam, kann nicht mehr analysiert werden. Um den exakten Entstehungszeitpunkt einzugrenzen, müsste eine Vorhersage darüber getroffen werden können, aus welchem Follikel sich zukünftig ein ZOF entwickeln wird. Dies ist bei natürlich vorkommenden ZOF kaum realisierbar.

Eine Möglichkeit, definiertes Ausgangsmaterial für Untersuchungen zu erhalten, stellt die Induktion artifizieller ZOF im Tiermodell dar. In den letzten Jahren wurden verschiedene Modelle entwickelt, die eine Inhibierung der Ovulation und anschließend die

Entwicklung eines ZOF induzieren. Es konnten bisher verschiedene Modelle etabliert werden, die über eine systemische Anwendung verschiedener Hormone agieren, wie eine verlängerte Gabe von Progesteron, eine mehrmalige Applikation des Adenocorticotropen Hormons (ACTH), eine Anwendung von Antiseren gegen das luteinisierende Hormon (LH) oder auch eine Kombination verschiedener hormoneller Substanzen. Allerdings sind bisher nur wenige Erkenntnisse über Modelle vorhanden, die über eine gezielte lokale Manipulation am Follikel, ohne eine systemische Auslenkung des Endokriniums, zur Bildung von ZOF führen.

Auch ist die Langzeitentwicklung der induzierten Strukturen in diesen Modellen bisher nicht beschrieben worden. Diese ist aber gerade bei der ZOF-Problematik von Interesse. Das Ziel der vorliegenden Studie war es deshalb, ein Modell zur Induktion von ZOF (ZOF-Modell) durch eine lokale intrafollikuläre Anwendung von Cyclooxygenase-1- und -2- (COX-1 und -2) Inhibitoren beim Rind zu etablieren, ohne den ovariellen Zyklus systemisch zu manipulieren.

Abgeleitet aus der Literatur und basierend auf der Kenntnis, dass der intrafollikuläre Prostaglandin-Anstieg einen Schlüsselfaktor für die Ovulation darstellt, ist die Hypothese dieser Arbeit, dass durch die intrafollikuläre Anwendung eines COX-Inhibitors primär die Ovulation auf lokaler Ebene unterdrückt wird und sich anschließend ZOF entwickeln können.

Hierfür wurden in einer ersten Arbeit transvaginale ultraschallgeleitete Injektionen mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Indomethacin in präovulatorische Follikel durchgeführt.

In einer zweiten Arbeit wurden die Wirkungen weiterer COX-Inhibitoren im Sinne der Überprüfung der Reproduzierbarkeit und der Spezifizierung des Modells getestet.

Die Auswirkungen der intrafollikulären Injektionen wurden durch nachgeordnete Untersuchungen der Follikelflüssigkeiten, durch Blutentnahmen für Hormonbestimmungen und durch ultrasonographische Ovaruntersuchungen analysiert.

II. LITERATURÜBERSICHT

1. Physiologie des ovariellen Zyklus

Der ovarielle Zyklus beim Rind hat eine Länge von 18-24 Tagen und ist unterteilt in die 3- bis 5-tägige Follikelphase und die 16- bis 19-tägige Gelbkörperphase (GRUNERT und BERCHTOLD, 1999; ENGELHARDT et al., 2010). Während der Follikelphase kommt es zum zyklischen Heranreifen des präovulatorischen Follikels. Mit der Ovulation des präovulatorischen Follikels beginnt die Gelbkörperphase.

Die Follikelphase umfasst den Prozess der Rekrutierung einer Follikelkohorte, der Selektion eines dominanten Follikels und der Differenzierung zum präovulatorischen Follikel (PETER, 2004; BERISHA und SCHAMS, 2005). Diese Vorgänge stehen unter der engen hormonellen Kontrolle des Gonadotropin freisetzenden Hormons (GnRH) aus dem Hypothalamus, des Follikel stimulierenden Hormons (FSH) und des LH aus dem Hypophysenvorderlappen und der dazugehörigen Rezeptoren an den *Theca interna*- und Granulosazellen des Ovars (BERISHA und SCHAMS, 2005; SENGER, 2012). Die Phase der Rekrutierung steht in Abhängigkeit der FSH-Sekretion, im Gegensatz zur Phase der Selektion mit der Ausbildung des dominanten Follikels, welche in Abhängigkeit der LH-Freisetzung steht (WEBB et al., 1999; ENGELHARDT et al., 2010; SENGER, 2012).

Die Rekrutierung einer Follikelkohorte beginnt mit dem Auftreten von Follikeln, die einen Durchmesser von über 4 mm aufweisen (WEBB et al., 1998; WILTBANK et al., 2002). In den wachsenden Follikeln wird durch eine FSH-Sekretion aus dem Hypophysenvorderlappen die Östrogen-Synthese stimuliert. Die Bildung von Östrogen erfolgt über einen durch FSH stimulierten Aromatisierungsprozess in den Granulosazellen des Follikels. Das hierfür benötigte Enzym Aromatase ist ausschließlich in den Granulosazellen vorhanden. Die Bildung der Androgene erfolgt in den Thekazellen des Follikels über einen durch eine basale LH-Sekretion aus dem Hypophysenvorderlappen stimulierten cAMP-vermittelten Reaktionsweg. Neben dem durch FSH stimulierten steigenden Östrogengehalt des Follikels kommt es während der Phase der Rekrutierung und der frühen Selektion ebenfalls zum Anstieg der intrafollikulären Inhibinbildung (ENGELHARDT et al., 2010).

Die vermehrte intrafollikuläre Produktion von Östrogenen wirkt zum einen stimulierend auf die Proliferation der Granulosazellen und trägt so indirekt auch zur weiteren Vermehrung der FSH-Rezeptoren am Follikel bei.

Zudem verhindern Östrogene eine Fas Ligand- (FALSG) und eine Fibroblasten-

Wachstumsfaktor 18- (FGF-18) induzierte Apoptose der Zellen (QUIRK et al., 2006; PORTELA et al., 2015; PRICE und ESTIENNE, 2018) und induzieren die Einsprossung von neuen Gefäßen am Follikel. Zum anderen führen die steigenden Östrogen- und Inhibinkonzentrationen zu einem negativen Feedback auf die Hypophyse mit Senkung der FSH-Sekretion (ENGELHARDT et al., 2010). Dennoch erhält der östrogenreiche Follikel durch seine vermehrte Anzahl an FSH-Rezeptoren und die verbesserte Vaskularisation eine größere Menge FSH.

Kleinere Follikel mit nicht ausreichender FSH-Bindung und somit niedriger Östrogen-Synthese androgenisieren und atresieren später (ENGELHARDT et al., 2010).

Neben den intrafollikulären hormonellen Veränderungen kommt es während der Rekrutierungsphase zu einem Anstieg der Expression des insulin-ähnlichen Wachstumsfaktors 1 (IGF-1) in den Zellen der *Theca interna* (BERISHA et al., 2016).

Neben dem Anstieg der IGF-1-Expression scheinen auch die knochenmorphogenetischen Proteine 4 und 7 (BMP-4 und BMP-7), beides Mitglieder der transformierenden Wachstumsfaktor β - (TGF β) Familie, einen maßgeblichen Einfluss auf den Rekrutierungs- und Selektionsprozess zu haben. Beide stimulieren die Östrogen-Synthese und die FSH-Rezeptor-Expression und inhibieren gleichzeitig über eine Reduktion der Expression der messenger Ribonukleinsäure (mRNA) des Steroid akut Regulator Proteins (StAR) die Progesteron-Synthese. Zudem tragen sie zur Induktion der beginnenden Angiogenese im Follikel bei (PRICE und ESTIENNE, 2018).

In der späten Phase der Selektion kommt es zu einer Zunahme der intrafollikulären IGF-1- und -2- Konzentrationen, sowie der Expression ihrer Rezeptoren sowohl in den *Theca interna*- als auch den Granulosazellen. Dieser Anstieg, bei gleichzeitigem Absinken der Gehalte an insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren bindenden Proteinen (IGFBP), scheint unter anderem einer der entscheidenden Faktoren zu sein, die zur Ausbildung der Dominanz eines Follikels führen (YUAN et al., 1998; BERISHA und SCHAMS, 2005). Das Absinken der IGFBP-Gehalte wird in einer FSH-abhängigen Inhibierung von deren Synthese gesehen (WEBB et al., 1999).

Mit der Ausprägung der Dominanz eines Follikels kommt es durch die immer weiter steigenden Östrogen- und Inhibinspiegel im Blut zu einem negativen Feedback auf die FSH-Sekretion, bei gleichzeitig positivem Feedback auf die LH-Freisetzung. Ein dominanter Follikel muss dementsprechend von einer FSH-abhängigen Östrogenproduktion auf eine LH-abhängige Synthese umstellen, um seine Dominanz zu erhalten und nicht zu atresieren (WEBB et al., 1999; ENGELHARDT et al., 2010; SENGER, 2012). Der Wechsel von einer FSH-abhängigen Größenzunahme auf eine LH-

abhängige Reifung erfolgt bei einer Follikelgröße zwischen 7-9 mm (WEBB et al., 1998; ORTEGA et al., 2015). Ultrasonographische Untersuchungen von MIYAMOTO et al. (2006) ergaben, dass die Dominanz eines Follikels ab einer Größe von 8,5 mm identifiziert werden kann. Ein dominanter Follikel zeigt danach eine Wachstumsdynamik von 1,1-1,7 mm Zunahme im Durchmesser pro Tag (SIROIS und FORTUNE, 1988), wohingegen

ROTH et al. (2012) mit $0,8 \pm 0,2$ mm/Tag von niedrigeren Wachstumsraten ausgehen. Erreicht der dominante Follikel seine Maximalgröße, wird eine um bis auf das Vierfache gesteigerte Expression der mRNA für den LH-Rezeptor sowohl in den Zellen der *Theca interna* als auch in den Granulosazellen beobachtet, bei gleichzeitigem Absinken der Expression der FSH-Rezeptoren, was ihn als präovulatorischen Follikel kennzeichnet (WILTBANK et al., 2002; PRICE und ESTIENNE, 2018). Durch die anhaltend hohe Östrogen-Synthese kommt es zum ovulationsauslösenden LH-Peak (ENGELHARDT et al., 2010).

1.1. Ovulation

Der präovulatorische LH-Peak induziert den Umschwung der intrafollikulären Östrogen-Synthese auf eine Progesteron-Produktion und somit die beginnenden Luteinisierung. Die intrafollikulären Progesteron-Werte im präovulatorischen Follikel erreichen Konzentrationen von $489,0 \pm 36,5$ ng/ml, wohingegen die Östradiol-Werte auf $226,3 \pm 34,9$ ng/ml absinken (VERNUNFT et al., 2013). Etwa 12 Stunden nach dem LH-Peak fallen die Östradiol-Werte im Blutplasma ebenfalls auf basale Konzentrationen ab (ACOSTA et al., 2003).

Durch den intrafollikulären Progesteron-Anstieg kommt es unter anderem zur Aktivierung von Kollagenasen, die über den Gewebsabbau maßgeblich an der Stigmabildung beteiligt sind (SENGER, 2012). Das Kollagengewebe macht im präovulatorischen Follikel nicht mehr als 20 % der Wanddicke aus (ESPEY, 1994).

Neben der Induktion der Progesteron-Synthese, stimuliert der LH-Peak zudem die Bildung von Prostaglandin $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) und PGE_2 . Diese Prostaglandine unterstützen die Stigmabildung am präovulatorischen Follikel und erhöhen die Kontraktionsbereitschaft der glatten Muskulatur am Ovar. Zusammen mit dem starken Anstieg von Angiotensin-II (Ang-II) nach dem LH-Peak kommt es zu einer verstärkten Durchblutung des präovulatorischen Follikels und zu einer Ödematisierung der *Theca interna* (ESPEY, 1994; ACOSTA et al., 2000; SENGHER, 2012).

Die komplexen Umbauvorgänge im präovulatorischen Follikel führen letztlich zur

Ruptur der Follikelwand und zur Freisetzung der Eizelle im *Cumulus oocytan*-Komplex. Zum Zeitpunkt der Ovulation weisen Follikel laut SILVIA et al. (2002) einen Durchmesser von 13-17 mm auf. Differenziert werden muss jedoch zwischen Färsen, die durchschnittlich kleinere Follikel mit einer Größe von $14,8 \pm 0,2$ mm ovulieren, und multiparen Kühen, deren ovulatorische Follikelgrößen bei $17,4 \pm 0,5$ mm liegen (WILTBANK et al., 2002). Andere Studien konnten hingegen zeigen, dass die meisten Follikel mit einer Größe zwischen 16-20 mm ovulieren (KESLER et al., 1979), aber auch durchaus Durchmesser von 20 mm überschritten werden können (SAVIO et al., 1990). Aus dem ovulierten Follikel bildet sich im Weiteren der Gelbkörper.

1.2. Gelbkörperfunktion

Nach der Ovulation bildet sich aus dem präovulatorischen Follikel der Gelbkörper, dessen Hauptaufgabe die Synthese von Progesteron ist. Seine Lebensspanne umfasst beim zyklischen Rind ungefähr 19 Tage und enthält die Phasen des Wachstums, des Erhalts und der Regression (MIYAMOTO et al., 2005; HERZOG et al., 2010).

Zu Beginn der Gelbkörperentwicklung bildet sich das *Corpus haemorrhagicum*, welches für ein bis drei Tage bestehen bleibt und aus dem sich im Weiteren das *Corpus luteum* bildet (ENGELHARDT et al., 2010; SENGGER, 2012).

Während der Bildung des *Corpus luteum* kommt es zur Auflösung der Basalmembran, sodass eine Mischung der *Theca interna*- und der Granulosazellen erfolgt. Aus den Thekazellen bilden sich die kleinen Luteinzellen, welche etwa 70 % der steroidproduzierenden Zellen des Gelbkörpers ausmachen und eine Größe von 10-22 μ m haben. Aus den Granulosazellen entwickeln sich die großen Luteinzellen, die etwa 30 % der Steroidzellen ausmachen und eine Größe von über 25 μ m haben (ALILA et al., 1988; FIELDS und FIELDS, 1996; WEEMS et al., 2006). Die steroidaktiven großen und kleinen Luteinzellen machen insgesamt 70 % der gesamten Gelbkörpermasse aus (FIELDS und FIELDS, 1996). Zeitgleich kommt es zur Einwanderung von Gefäß- und Blutzellen, sowie von Fibroblasten, sodass fast jede Luteinzelle ihr eigenes Kapillarnetz erhält (ENGELHARDT et al., 2010; SENGGER, 2012).

Während der ersten Tage nach der Ovulation erfolgt ein massives Wachstum des *Corpus luteum*, wobei die Größenzunahme der kleinen Luteinzellen durch eine Hyperplasie und die der großen Luteinzellen durch eine Hypertrophie erfolgt (FIELDS und FIELDS, 1996; SENGGER, 2012). Am Tag vier weist der Gelbkörper durchschnittlich eine ultrasonographisch messbarer Fläche von $2,1 \pm 0,1$ cm² auf. Diese wird bis Tag acht mehr als verdoppelt auf eine Größe von $4,5 \pm 0,2$ cm². An die Wachstumsphase schließt sich

eine statische Phase an, während der nur noch eine geringe Größenzunahme beobachtet wird. Die größte Ausdehnung wird an Tag 14 mit $5,6 \pm 0,3 \text{ cm}^2$ erreicht. Danach folgt die Phase der Regression, bei der es zur stetigen Abnahme der Gelbkörpergröße kommt (HERZOG et al., 2010).

Die massive Größenzunahme in der frühen Phase der Gelbkörperbildung ist positiv korreliert mit dem Anstieg der Progesteron-Synthese und einer ultrasonographisch messbaren verstärkten Durchblutung des Gelbkörpers (MIYAMOTO et al., 2006). Nach HERZOG et al. (2010) ist der Anstieg der Durchblutung des *Corpus luteum* stärker korreliert mit der Progesteron-Synthese als dessen Größenzunahme mit der Progesteron-Synthese.

Die Progesteron-Synthese erfolgt sowohl in den kleinen als auch in den großen Luteinzellen, wobei die großen Luteinzellen etwa 70-80 % der Progesteron-Produktion übernehmen und weitestgehend LH-unabhängig sind. Die kleinen Luteinzellen benötigen hingegen LH als Aktivator und übernehmen nur 30 % der Progesteron-Produktion (WILTBANK, 1994; DIAZ et al., 2002; WEEMS et al., 2006).

Die Syntheseleistung steht unter der Kontrolle der Expression von StAR und der 3β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase (3β -HSD). Hierbei stellt die Aktivität der StAR, welche für den Transport des Cholesterols von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran zuständig ist, den limitierenden Schritt dar (DIAZ et al., 2002). Die Regulation der StAR-Expression erfolgt unter anderem über den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF) und FGF-2 (ENGELHARDT et al., 2010; SKARZYNSKI et al., 2013). Eine Inhibition der Progesteron-Produktion kann über die Aktivierung des Protein-Kinase-C-Wegs erfolgen (DIAZ et al., 2002).

Die Wirkung des Progesterons entfaltet sich sowohl para- als auch autokrin über die Progesteron-Rezeptoren an den kleinen und großen Luteinzellen, sowie an den Rezeptoren der Endothelzellen. Die höchste Expression dieser Rezeptoren wurde während der frühen Gelbkörperentwicklung festgestellt (SKARZYNSKI et al., 2013). Durch die steigende Progesteron-Konzentration, die aus dem Gelbkörper in die Blutbahn gelangt, kommt es zu einem negativen Feedback auf die GnRH-Sekretion aus dem Hypothalamus, sodass zwar noch eine Bildung von Follikelwellen beobachtet wird, aber ein LH-Peak und somit eine Ovulation verhindert wird (ENGELHARDT et al., 2010). Gleichzeitig wirkt Progesteron einem Abbau des Gelbkörpers entgegen, unter anderem über die Inhibierung der Cytokin-induzierten Apoptose der Luteinzellen (RUEDA et al., 2000; SKARZYNSKI et al., 2013).

Die Durchblutung des Gelbkörpers, welche vor allem in den ersten 5 Tagen der

Entwicklung deutlich zunimmt, wird maßgeblich durch VEGF und FGF-2 induziert (MIYAMOTO et al., 2006; LÜTTGENAU et al., 2011). Sowohl VEGF als auch FGF-2 gelten als potente Stimulatoren angiogenetischer Faktoren. VEGF ist hierbei ein spezifischer Stimulator der Endothelzellproliferation und -migration, der über die Interaktion mit zwei verschiedenen Tyrosin-Kinase-Rezeptoren seine Wirkung entfaltet (SKARZYNSKI et al., 2013). Zum Ende der Gelbkörperphase kommt es um den Tag 16 aufgrund einer Sekretion von $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus dem nicht graviden Uterus zur Luteolyse. Das $\text{PGF}_{2\alpha}$ gelangt nach einem Gegenstromprinzip über kleine Gefäße direkt an das Ovar (ENGELHARDT et al., 2010). Am Ovar lässt sich zu Beginn der frühen Luteolyse aufgrund einer Vasodilatation der Arteriolen ein zweiter ultrasonographisch messbarer Anstieg der Gelbkörperdurchblutung beobachten, auf den einen Tag später auch der Abfall der Progesteron-Werte im Blut folgt. Auf die anfängliche Vasodilatation folgt eine Vasokonstriktion mit Abnahme der Durchblutung und einer etwa zwei bis drei Tage später einsetzenden strukturellen Regression des Gelbkörpers (MIYAMOTO et al., 2005; HERZOG et al., 2010).

Der sich zurückbildende Gelbkörper kann noch bis für zu drei Tage des Folgezyklus als sogenanntes *Corpus albicans* bestehen bleiben (STUDER, 1975).

2. Cyclooxygenase-System

2.1. Cyclooxygenase-Subtypen

Cyclooxygenasen (COX) stellen die wesentlichen Schlüsselenzyme für die Bildung von Prostaglandinen dar. Sie sind ebenfalls unter der Bezeichnung Prostaglandin-H-Synthasen beziehungsweise Prostaglandin-Endoperoxid-H-Synthasen (PGHS) bekannt und sind in drei verschiedenen Isoformen vorhanden (SMITH et al., 2000; SIROIS et al., 2004; LÖFFLER und PETRIDES, 2014). COX sind der geschwindigkeitsbestimmende Schritt für die Bildung der Prostaglandine G_2 und H_2 (PGG_2 , PGH_2) und die weitere Prostaglandin-Synthese.

Sie agieren über zwei aufeinanderfolgende katalytische Reaktionen: Als Erstes erfolgt eine Cyclooxygenase-Reaktion, bei der durch die Bioxygenierung aus Arachidonsäure mit zwei zusätzlichen Sauerstoffmolekülen PGG_2 gebildet wird. In einem zweiten Schritt schließt sich die Peroxidase-Reaktion an, bei der die Reduktion um zwei Elektronen von PGG_2 zu PGH_2 erfolgt (VANE und BOTTING, 1998; SMITH et al., 2000). Die beiden Reaktionen laufen an unterschiedlichen, aber strukturell miteinander verbundenen Stellen des Enzyms ab. Die Peroxidase-Aktivität, welche in vitro auch unabhängig von der

Cyclooxygenase-Reaktion ablaufen kann, ist an der Proteinoberfläche der hämhaltigen aktiven Seite des Enzyms lokalisiert. Die Cyclooxygenase-Reaktion, welche in Abhängigkeit der Peroxidase-Aktivität steht, findet hingegen in einem hydrophoben Kanal im Kern des Enzyms statt (SMITH et al., 2000). Die Aktivierung der COX erfolgt über eine Oxidation der Hämgruppe, welche durch Hydroperoxide hervorgerufen wird. Die verschiedenen COX-Isoformen weisen hierbei eine unterschiedlich starke Aktivierbarkeit durch Hydroperoxide auf. Das gebildete PGG₂ aktiviert wiederum autokatalytisch weitere COX-Moleküle und hält somit die COX-Reaktion aufrecht (SMITH et al., 2000).

Sowohl PGG₂ als auch PGH₂ stellen instabile Zwischenstufen der Prostaglandine dar (Sirois et al., 2004, Berisha et al., 2019). Letztendlich erfolgt in einem dritten Schritt der Prostaglandin-Biosynthese über spezifische Prostaglandin-Synthasen (PGS) die Bildung der einzelnen Prostaglandine wie z. B. E₂ und D₂ (PGE₂, PGD₂).

Es werden drei Isoformen der COX unterschieden: Die COX-1 ist ein konstitutiv exprimiertes Enzym, welches überwiegend homöostatische Funktionen übernimmt und an zellulären Differenzierungsvorgängen beteiligt ist (SMITH et al., 2000; HAWKEY, 2001; TANABE und TOHNAI, 2002). Es ist in sämtlichen Gefäßendothelien, den Mono- und Thrombozyten, dem renalen Tubulussystem, der Bläschendrüse und dem Magen-Darm-Trakt zu finden (HAWKEY, 2001; TANABE und TOHNAI, 2002). Das COX-1 Gen weist beim Menschen eine Länge von 22 kb auf und wird als 2,8 kb lange mRNA transkribiert, welche überwiegend am endoplasmatischen Retikulum lokalisiert ist (TANABE und TOHNAI, 2002). Die COX-1 besteht aus insgesamt 576 Aminosäuren (SMITH et al., 2000) und hat eine dreidimensionale Struktur, bei der jedes Dimer aus drei Untereinheiten besteht: einer epidermalen growth-factor-like Domäne, einer Membran bindenden Seite und einer enzymatischen Domäne. Die Peroxidase-aktive Seite ist der COX-aktiven Seite anliegend, aber nicht direkt mit ihr verbunden. Die COX-aktive Seite ist hierbei als langer hydrophober Kanal gestaltet (VANE und BOTTING, 1998). Die durch die COX-1 produzierten Prostaglandine werden meist für den Erhalt physiologischer, kontinuierlich ablaufender Prozesse benötigt, wie beispielsweise die Homöostase (SMITH et al., 2000).

Die COX-2 ist hingegen ein durch inflammatorische oder pathologische Vorgänge induzierbares Enzym (SMITH et al., 2000). Sie ist mit einer Gen-Länge von nur 8,3 kb deutlich kompakter als die COX-1. Allerdings ist das COX-2-Transkript mit ungefähr 4,4 kb länger und stärker konserviert als das COX-1-Transkript und vorrangig perinuklear lokalisiert (TANABE und TOHNAI, 2002). Die COX-2 besteht aus 587

Aminosäuren und ist der Sequenz der COX-1 zu 60-65 % identisch (SMITH et al., 2000). Die dreidimensionale Struktur der COX-2 ist der der COX-1 sehr ähnlich, mit Ausnahme einer größeren enzymatisch aktiven Seite (für die Bindung größerer Strukturen) bedingt durch den Austausch dreier Aminosäuren, einem um 17 % größeren zentralen Kanal und einer zweiten internen Tasche (VANE und BOTTING, 1998; SMITH et al., 2000). Die durch die COX-2 synthetisierten Prostaglandine dienen meist als Mediatoren für Stressreize, wie bei inflammatorischen Geschehen, der Hyperpolarisation von Nervenzellen oder mechanische Noxen (SMITH et al., 2000). Zur Induktion der COX-2 kommt es zum einen durch entzündungsanregende Faktoren, wie unter anderem das Interleukin-1 (IL-1), der Tumornekrosefaktor α (TNF α) und Lipopolysaccharide (LPS), aber auch durch die Hormone FSH, LH und Östradiol, verschiedene Wachstumsfaktoren und Onkogene (TANABE und TOHNAI, 2002). Aus in vitro Versuchen ist bekannt, dass die COX-2 mit einer 10-fach niedrigeren Menge an Hydroperoxiden aktiviert werden kann als die COX-1.

Als letzte Isoform wurde die COX-3 entdeckt, welche bisher bei Hunden, Menschen, Ratten und Mäusen gefunden wurde (CHANDRASEKHARAN et al., 2002; KIS et al., 2003; SHAFTEL et al., 2003). Sie gilt als alternative Splicingvariante der COX-1, bei der das Intron 1 erhalten bleibt. Die COX-3 wird vor allem in der Großhirnrinde exprimiert, bei Menschen auch am Herzen. Ihre Expression dient vermutlich der Synthese von Prostaglandinen, welche für die Mediation von Fieber und Schmerz zuständig sind (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

2.2. Cyclooxygenase-Expression am Ovar

Hinsichtlich des reproduktiven Geschehens im Ovar nimmt vor allem die Expression der COX-2 eine zentrale Rolle ein und gilt als ein wichtiger Ovulationsmarker. Die Expression der COX-1 bleibt im Ovar hingegen auf einem niedrigen Niveau (SIROIS, 1994; LIU und SIROIS, 1998).

Die COX-2-Expression erfolgt gonadotropin-abhängig in Follikeln, die eine Mindestgröße von 8 mm erreicht haben, und ist auch durch exogen angewendete Gonadotropine induzierbar (SIROIS, 1994; LIU und SIROIS, 1998; BERISHA et al., 2019). Durch einen LH-Peak kommt es zur Induktion der Proteinkinase A, welche das sogenannte E-Box-Element der COX-2 induziert. Das E-Box-Element ist einer der Schlüsselfaktoren für die COX-2-Transkription (LIU et al., 1999; WU und WILTBANK, 2002). Neben der Induktion durch LH sind weitere direkte Aktivatoren der COX-2-Expression in Granulosazellen bekannt, wie das IL-1 bei Menschen (Narko et al., 1997)

und Ratten (Ando et al., 1998), der TGF- α bei der Henne (Li et al., 1996) und der Wachstums-Differenzierungsfaktor 9 (GDF-9) bei der Maus (Elvin et al., 1999).

LIU und SIROIS (1998) konnten in 76 % der präovulatorischen Follikel 24 Stunden nach einer Anwendung des humanen Choriongonadotropin (hCG) eine COX-2-Expression nachweisen; diese Follikel zeigten im Weiteren einen physiologischen Luteinisierungsprozess. Die 24 % der COX-2 negativen Follikel zeigten im Folgenden keine Luteinisierung, dafür eine erhaltene Östradiol-Produktion bei niedrigen Progesteron-Werten.

Immunhistochemisch kann eine vermehrte COX-2-Expression im präovulatorischen Follikel vor allem in den Granulosazellen mit zunehmender Intensität in Richtung der Basalmembran und in 90 % der hochprismatischen Zellen der Basalmembran nachgewiesen werden. Während der ersten ein bis zwei Tage nach der Ovulation wird COX-2 überwiegend in den Granulosazellen des vorherigen Antrums exprimiert. Die Granulosazellen, welche COX-2 positive Zellen umranden, zeigten hingegen keine COX-2-Expression. Bei einem drei bis vier Tage alten *Corpus luteum* konnten nur noch vereinzelt COX-2 positive Granulosazellen gefunden werden (BERISHA et al., 2019). AROSH et al. (2004) konnten hingegen über die gesamte Gelbkörperphase (Entwicklung, Erhaltung und Regression) eine gleichbleibend starke Färbung des COX-2-Proteins feststellen. Auch hier zeigten sich nur die großen Luteinzellen als COX-2 positiv; weder in den kleinen Luteinzellen, noch in allen anderen ovariellen Zellen konnte eine COX-2-Expression nachgewiesen werden (AROSH et al., 2004).

Bei den verschiedenen Tierarten kommt es zu unterschiedlich schneller COX-Induktion nach Ovulationsinduktion mit hCG oder GnRH. So steigt die COX-2-Expression bei der Ratte schon etwa 2-4 Stunden nach einer hCG-Stimulation an, wohingegen bei Kühen eine verstärkte Expression erst 18 Stunden nach hCG- oder auch GnRH-Anwendung auftritt. Maximale Konzentrationen wurden nach 24 Stunden gemessen (SIROIS, 1994).

BERISHA et al. (2019) untersuchten ebenfalls die COX-2-Expression am präovulatorischen bovinen Follikel nach Anwendung von GnRH. Es wurde ein zweifacher Anstieg der COX-2-Expression sowohl 4 als auch 20 Stunden nach GnRH-Administration festgestellt.

Beim Pferd erfolgt die Hochregulation der COX-2 sogar erst 30 Stunden nach hCG-Applikation. Allen Tierarten ist allerdings gemein, dass ab dem Zeitpunkt der COX-Induktion etwa 10 Stunden später eine Ovulation erwartet werden kann, sodass SIROIS et al. (2004) zusammenfassend davon ausgehen, dass der Zeitpunkt der COX-2-Induktion die speziesspezifische Länge des Ovulationsprozesses bestimmt.

Dass die Hochregulation der COX-2 und der damit verbundene Anstieg der Prostaglandine die Schlüsselmediatoren der Ovulation sind, zeigten schon früh sowohl LANGENBACH et al. (1995) als auch LIM et al. (1997) anhand von Mausmodellen. Mäuse mit einer Null-Mutation für COX-1 waren zwar fertil (LANGENBACH et al., 1995), aber hatten vermehrt lebensschwache Nachkommen (DAVIS et al., 1999). Betraf die Mutation hingegen die COX-2, kam es zu Infertilität aufgrund diverser reproduktiver Störungen, angeführt von anovulatorischen Zyklen, einer Störung der Stigmabildung und der Aufrechterhaltung des *Cumulus oophorus* (LIM et al., 1997; DAVIS et al., 1999). Nach DAVIS et al. (1999) war wiederum eine Aufhebung des COX-2-defizitären Zustandes und somit die Regenerierung der reproduktiven Fitness über die Gabe von Prostaglandinen oder IL-1 β möglich.

2.3. Prostaglandine

Prostaglandine werden zusammen mit Thromboxanen und Leukotrienen unter der Familie der Eicosanoide zusammengefasst, welche sich von der vierfach ungesättigten C₂₀-Fettsäure Arachidonsäure ableiten (HORN et al., 2005; LÖFFLER und PETRIDES, 2014). Prostaglandine und Thromboxane werden durch COX synthetisiert, wohingegen Leukotriene über den Lipxygenase-Weg gebildet werden.

Prostaglandine stellen Schlüsselmediatoren bei Entzündungsprozessen dar und entfalten aufgrund ihrer sehr geringen Halbwertszeit überwiegend para- und autokrine Wirkungen (HORN et al., 2005; LÖFFLER und PETRIDES, 2014). Aufgrund ihrer hydrophilen Eigenschaften gelangen sie kaum durch Zellmembranen und wirken in der Hauptsache über transmembrane G-Protein-gekoppelte Rezeptoren und nur zu einem geringen Anteil durch eine direkte Interaktion mit Zellkernrezeptoren (SMITH et al., 2000; SIROIS et al., 2004). Hervorzuheben ist hierbei die Spezifität der verschiedenen Prostaglandine zu ihren jeweiligen Rezeptoren.

Ihre Bildung findet über eine dreiphasige Biosynthese statt, bei der die mittlere, geschwindigkeitsbestimmende Reaktion über die COX-Reaktion abläuft.

Zu Beginn erfolgt die Freisetzung von Arachidonsäure aus der Zellmembran über das Phospholipase A-Enzym. Als zweiter Schritt findet die Bildung von PGG₂ und PGH₂ über die zuvor beschriebene COX-Aktivität statt. Sowohl PGG₂ als auch PGH₂ stellen instabile Zwischenstufen der Prostaglandine dar (SIROIS et al., 2004; BERISHA et al., 2019). Der dritte Schritt der Biosynthese erfolgt über spezifische PGS, welche über die Isomerisierung von PGH₂ zur Bildung der Prostaglandine E₂ und D₂ (PGE₂, PGD₂) führen. PGF_{2 α} wird sowohl direkt aus PGG₂ als auch aus PGE₂ durch die Aktivität einer

Oxoreduktase gebildet (BERISHA et al., 2019).

Unter den Prostaglandinen stellt PGE₂ eine der Hauptkomponenten bei inflammatorischen Geschehen dar (VANE und BOTTING, 1998).

2.4. Einfluss der Prostaglandine auf die Ovulation

Der Anstieg von Prostaglandinen im präovulatorischen Follikel, hierbei vor allem PGE₂, gilt als Auslöser der Ovulation (KIM und DUFFY, 2016). Die Synthese der Prostaglandine erfolgt durch die gonadotropin-abhängige Induktion der COX-2 in den Granulosazellen des Follikels (SIROIS, 1994). Der Prostaglandin-Transport ist sowohl über passive Diffusion als auch über spezielle Transporter möglich (Banu et al., 2003, Fortune et al., 2009). PGE₂ entfaltet seine Wirkung über vier verschiedene G-Proteingekoppelte Rezeptoren, die durch LH reguliert werden (WEEMS et al., 2006, KIM und DUFFY, 2016).

Durch den Einfluss der Prostaglandine kommt es neben der Stimulation der intrafollikulären Progesteron-Synthese auch zur Aktivierung der Proteolyse beziehungsweise Kollagenolyse der extrazellulären Matrix. Die Aktivierung dieser Umbauvorgänge steht in Verbindung mit einer Stigmabildung im präovulatorischen Follikel (PETERS et al., 2004, WEEMS et al., 2006).

PETERS et al. (2004) konnten zeigen, dass die PGE₂-Konzentration in der Follikelflüssigkeit von bovinen präovulatorischen Follikeln nach GnRH-Injektion kontinuierlich bis zum Zeitpunkt der Ovulation ansteigt. Zur Stunde 0, dem Zeitpunkt der ovulationsauslösenden GnRH-Anwendung, lag die PGE₂-Konzentration mit kaum detektierbaren Werten bei 0,014 ng/ml, stieg bis Stunde 18 auf 0,396 ng/ml an und erreichte die höchsten Werte zur Stunde 24 mit 34,4 ng/ml (PETERS et al., 2004).

Einen ähnlichen Anstieg der PGE₂-Werte konnten LI et al. (2006) ebenfalls in bovinen präovulatorischen Follikeln nachweisen: Zum Zeitpunkt der GnRH-Anwendung wurde eine durchschnittliche PGE₂-Konzentration von 0,35 ng/ml gemessen, welche 24 Stunden später 62,89 ng/ml anstieg (LI et al., 2006). In einer Folgestudie wurde gezeigt, dass auch die PGF_{2α}-Konzentration im präovulatorischen Follikel vom Zeitpunkt der GnRH-Injektion bis 24 Stunden später um das 300fache ansteigt (LI et al., 2007).

Ein noch stärkerer Anstieg der PGE₂-Konzentration in bovinen präovulatorischen Follikeln wurde in der Arbeit von BERISHA et al. (2019) beschrieben. Die zum Zeitpunkt der GnRH-Administration gemessene intrafollikuläre PGE₂-Konzentration lag bei 0,15 ng/ml und stieg 25 Stunden später auf 484,21 ng/ml an. In dieser Studie wurden

zudem Veränderungen der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration ermittelt. Auch hier konnte ein deutlicher Anstieg von Stunde 0 mit 0,04 ng/ml auf 101,01 ng/ml in Stunde 25 nach GnRH-Gabe nachgewiesen werden (BERISHA et al., 2019).

Neben dem essentiellen Anstieg der Prostaglandin-Konzentration in präovulatorischen Follikeln konnten sowohl PETERS et al. (2004) als auch LI et al. (2006) zeigen, dass die intrafollikuläre Injektion eines COX-Hemmers, wie Indomethacin oder NS-398, eine deutliche Reduktion der PGE_2 -Konzentration in der Follikelflüssigkeit nach sich zieht und eine Ovulation verhindert. In aspirierten Follikelflüssigkeiten aus Follikeln, die 24 Stunden nach der Anwendung von GnRH gewonnen wurden, konnte in mit Indomethacin injizierten Follikeln eine PGE_2 -Konzentration von 0,13 ng/ml gemessen werden (LI et al., 2006). In den von PETERS et al. (2004) mit NS-398 injizierten Follikeln lag die PGE_2 -Konzentration unter 8 ng/ml (PETERS et al., 2004; LI et al., 2006).

Der physiologische Anstieg der PGE_2 -Konzentration in präovulatorischen Follikeln ist im Einklang mit den weiter oben beschriebenen Expressionsmustern der COX-2 im Follikel zu sehen. Bei Rindern wurde eine verstärkte Expression der COX-2 18 Stunden nach hCG- oder auch GnRH-Anwendung gezeigt, wobei maximale Konzentrationen nach 24 Stunden gemessen wurden (SIROIS, 1994).

Die erhöhte Syntheserate des PGE_2 in den Granulosazellen hat einen stimulierenden Effekt auf die Progesteron-Produktion in der *Theca interna*, jedoch nicht in den Granulosazellen des präovulatorischen Follikels (BRIDGES et al., 2006; FORTUNE et al., 2009).

BRIDGES et al. (2006) konnten allerdings auch zeigen, dass Progesteron selbst die Bildung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ induziert. So kommt die Bildung der Prostaglandine in vitro zum Erliegen, wenn der Progesteron-Rezeptor-Antagonist Mifestrone hinzugefügt wird. Eine Aufhebung dieses Zustands ist wiederum durch die Zugabe eines Progesteron-Analogons möglich (BRIDGES et al., 2006). Ähnliche Beobachtungen konnten LI et al. (2007) machen, die über eine intrafollikuläre Injektion des 3β -HSD-Inhibitors Trilostane in den präovulatorischen Follikel die Progesteron-Produktion inhibierten und dadurch auch die Synthese von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ unterdrückt wurde. Bemerkenswert ist jedoch, dass die so behandelten Tiere dennoch physiologisch ovulierten (LI et al., 2007). In dominanten Follikeln, die noch nicht unter dem Einfluss eines LH-Peaks standen, kann zudem Oxytocin die Ausschüttung von PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$ aus den Granulosazellen induzieren (BRIDGES und FORTUNE, 2007).

2.5. Einfluss der Prostaglandine auf die Gelbkörperfunktion

Auch nach der Ovulation spielen die Prostaglandine eine entscheidende Rolle bei der Gelbkörperbildung, dessen Erhalt und der späteren Regression. Dominierend sind PGE_2 und $\text{PGF}_{2\alpha}$, wobei allgemein akzeptiert ist, dass PGE_2 luteotrophe Eigenschaften aufweist, wohingegen $\text{PGF}_{2\alpha}$ vorwiegend eine luteolytische Wirkung ausübt (JUENGEL et al., 1993; AROSH et al., 2004; SKARZYNSKI et al., 2013).

Die luteale Freisetzung beider Prostaglandine kann über die Injektion eines $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Analogons induziert werden (HAYASHI et al., 2003).

Die Synthesen beider Prostaglandine sind ausschließlich in den großen Luteinzellen des Gelbkörpers zu finden, wobei die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthase auf einem konstanten Niveau exprimiert wird, während die PGE_2 -Synthase einer starken Regulation während der verschiedenen Phasen der Gelbkörperentwicklung unterliegt. Vor allem während der frühen Wachstumsphase des *Corpus luteum* ist die PGE_2 -Synthase deutlich hoch exprimiert, was mit einer verstärkten Bildung von PGE_2 einherzugehen scheint. Während der Erhaltungsphase des *Corpus luteum* bleiben die Expressionsraten der PGE_2 -Synthase auf einem gleichbleibenden Niveau und fallen während der Regression wieder deutlich ab (AROSH et al., 2004). Insgesamt konnten in Trächtigkeitsgelbkörpern höhere Expressionsraten der PGE_2 -Synthase nachgewiesen werden als in zyklischen Gelbkörpern (SAKUMOTO et al., 2014).

PGE_2 wirkt durch seinen stimulierenden Effekt auf die Progesteron-Produktion in den großen und kleinen Luteinzellen als luteotropher Faktor (ALILA et al., 1988). Die Synthese von PGE_2 ist hierbei positiv mit der von Progesteron korreliert (KOTWICA et al., 2003). Progesteron wiederum sorgt für den Erhalt des Gelbkörpers und wirkt dessen Abbau entgegen (RUEDA et al., 2000; OKUDA et al., 2004).

Ein weiterer luteotropher Effekt des PGE_2 ist die Abschwächung der Caspase 3 Aktivität und die damit verbundene Hemmung der Apoptose der Endothel- und steroidaktiven Zellen (BOWOLAKSONO et al., 2008).

Auch die Rezeptoren über welche PGE_2 seine Wirkung entfaltet, sind vorrangig in der frühen Entwicklungsphase des Gelbkörpers hochreguliert (BERISHA et al., 2019). Im Widerspruch dazu konnten AROSH et al. (2004) allerdings erst ab dem 10. Tag der lutealen Phase eine maximale Expressionsrate des PGE_2 -Rezeptors EP3 nachweisen.

Neben den hohen PGE_2 -Konzentrationen in der frühen Phase der Gelbkörperentwicklung sind auch die Gehalte des Prostacyclins PGI_2 erhöht (MILVAE und HANSEL, 1983). In niedrigen Konzentrationen hat PGI_2 ebenfalls einen stimulierenden Effekt auf die Progesteron-Synthese und wirkt luteotroph, höhere Konzentrationen entfalten hingegen

eine umgekehrte Wirkung und inhibieren die luteale Progesteron-Synthese (ALILA et al., 1988).

Der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gehalt im *Corpus luteum* ist in den ersten Tagen der lutealen Entwicklung am höchsten und fällt danach ab (MILVAE und HANSEL, 1983; ACOSTA et al., 2002). Zudem wurde eine insgesamt höhere Konzentration von $\text{PGF}_{2\alpha}$ in Trächtigkeitsgelbkörpern gemessen als in zyklisch auftretenden Gelbkörpern (SAKUMOTO et al., 2014).

$\text{PGF}_{2\alpha}$ entfaltet seine Wirkung über einen Transmembranrezeptor, der vornehmlich an den großen Luteinzellen ausgebildet ist (ANDERSON et al., 2001; DIAZ et al., 2002).

In Zellkultursystemen konnte gezeigt werden, dass $\text{PGF}_{2\alpha}$ durch die Induktion der Progesteron-Synthese in Luteinzellen und die Hemmung der Apoptose auch luteotrophe Eigenschaften hat (ALILA et al., 1988; BOWOLAKSONO et al., 2008). Allerdings liegt die Vermutung nahe, dass die in Zellkulturen verwendete $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Konzentration supraphysiologischen Werten entspricht. In solch hohen Konzentrationen kann $\text{PGF}_{2\alpha}$ auch an die PGE_2 -Rezeptoren binden und auf diesem Weg zu einer Induktion der Progesteron-Synthese führen (SKARZYNSKI et al., 2013).

In vivo kommen dem $\text{PGF}_{2\alpha}$ hingegen vorrangig luteolytische Eigenschaften, abhängig vom Entwicklungsstand des Gelbkörpers, bei der Regulation des ovariellen Zyklus zu. So induziert $\text{PGF}_{2\alpha}$ erst ab Tag fünf nach der refraktären Phase des Gelbkörpers (PURSLEY et al., 1995) eine Expression der Mediatoren, die zur Auflösung des Gelbkörpers beitragen. Die Hemmung erfolgt zum einen über eine Inhibierung der Expression der StAR mRNA bei gleichzeitiger Stimulation luteolytischer Faktoren wie Endothelin-1 (ET-1) (MEIDAN et al., 1999, ATLI et al., 2012). Davor wirkt $\text{PGF}_{2\alpha}$ teilweise stabilisierend auf den Gelbkörper, beispielsweise über die Induktion von FGF-2 (SKARZYNSKI et al., 2013).

Zu Beginn der frühen Luteolyse an Tag 17-18 steigen die $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Metabolite im Plasma deutlich an. Der Anstieg des aus dem Uterus stammenden $\text{PGF}_{2\alpha}$ stimuliert die Produktion des Vasodilatators Stickstoffmonoxid in den Arteriolen des Gelbkörpers. Durch diese Vasodilatation kommt es während der frühen Phase der Luteolyse zur verstärkten Durchblutung des Gelbkörpers (MIYAMOTO et al., 2005). Der zu Beginn immense Anstieg der Durchblutung scheint einen Trigger für die folgende Luteolyse darzustellen (ACOSTA et al., 2002). Gleichzeitig bewirkt die Freisetzung des uterinen $\text{PGF}_{2\alpha}$ auch eine steigende Sezernierung von ET-1 und Ang-II im *Corpus luteum*. Beide Peptide führen zu einer Vasokonstriktion und zur Inhibierung der lutealen Progesteron-Produktion (MIYAMOTO et al., 2005). Zudem scheint es einen positiven Feedback-

Mechanismus zwischen der endometrialen und der lutealen $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Synthese zu geben: Geringe Mengen des endometrialen $\text{PGF}_{2\alpha}$ verstärken über die Induktion der COX-2 die Bildung von lutealem $\text{PGF}_{2\alpha}$ (DIAZ et al., 2002). Unter Abnahme der Durchblutung und der Progesteron-Konzentration kommt es so zur strukturellen Regression des Gelbkörpers (MIYAMOTO et al., 2005). Zusammenfassend wird davon ausgegangen, dass das aus dem Uterus sezernierte $\text{PGF}_{2\alpha}$ überwiegend zur funktionalen Luteolyse (Verlust der Progesteron-Synthese) und das aus dem *Corpus luteum* selbst stammende $\text{PGF}_{2\alpha}$ zur strukturellen Luteolyse (Auflösung des *Corpus luteum*) beiträgt (HAYASHI et al., 2003).

3. Zystische Ovarfollikel

3.1. Vorkommen zystischer Ovarfollikel

Zystische Ovarfollikel (ZOF) sind beim Rind laut VANHOLDER et al. (2006) mit einer Inzidenz von 6-30 % aufzufinden und führen zu einer verminderten Fertilität. Die starke Schwankungsbreite der Inzidenz scheint auf die verschiedenen Haltungsformen und das spezifische Management des Betriebs zurückzuführen zu sein. So liegen Inzidenzangaben anderer Autoren durchaus nur bei 6-19 % (KESLER und GARVERICK, 1982) oder auch 10-15 % (PETER, 2004). Bricht man das Vorkommen von ZOF auf Bestandsebene herunter, ist zu erkennen, dass einzelne Betriebe zum Teil lediglich Inzidenzen von 4 % aufweisen (BERGER, 1985).

Eine verschlechterte Fertilität durch das Auftreten von ZOF zeigt sich unter anderem an einem durchschnittlich um 22-64 Tage verlängerten Zwischenkalbeintervall (BORSBERRY und DOBSON, 1989). In einer weiteren Studie wurde sogar eine Verlängerung um bis zu 77 Tage gezeigt (KIM et al., 2005).

Die Bildung von ZOF ist eine reproduktive Störung, die vorrangig im postpartalen Zeitraum auftritt. In bis zu 71 % der Fälle entstehen ZOF in den ersten 45 Tagen post partum (WHITMORE et al., 1974). Häufiger betroffen sind multipare Milchkühe, im Vergleich zu Färsen oder Tieren fleischbetonter Rassen (KESLER und GARVERICK, 1982).

ZOF, die sich in den ersten 60 Tagen post partum bilden, weisen eine hohe Selbstheilungsrate von 60-65 % auf, im Gegensatz zu später gebildeten ZOF (VANHOLDER et al., 2006). In anderen Studien wurde zudem beobachtet, dass insbesondere ZOF, die vor der ersten Ovulation post partum entstehen, Selbstheilungsraten von bis zu 60 % aufweisen. ZOF, die sich nach der ersten Ovulation post partum bilden, zeigten in nur 20 % der Fälle eine Selbstheilung (MORROW et al.,

1966; KESLER et al., 1979).

Für früh auftretende ZOF konnten LOPEZ-GATIUS et al. (2002) bestimmte Risikofaktoren ausmachen, die deren Entstehung begünstigen: Tiere, die im Sommer abkalben, haben ein 2,6fach erhöhtes Risiko ZOF zu entwickeln im Vergleich zu Rindern, die im Winter kalben. Auch ein gestörtes Puerperium erhöht das Risiko einer ZOF-Bildung um das 1,9fache. Auf spät post partum auftretende ZOF scheinen diese Risikofaktoren keinen Einfluss zu haben (LOPEZ-GATIUS et al., 2002).

ZOF zeigen tendenziell eine multiple Ausprägung. So wurde in einer Studie von LEIDL et al. (1979) in 59 % der Fälle eine multiple ZOF-Bildung (zwei oder mehr ZOF) nachgewiesen. Die hierbei untersuchten ZOF waren zu 49 % bilateral auf beide Eierstöcke verteilt (LEIDL et al., 1979). BERGER (1985) beobachtete hingegen in nur 12 % der Fälle eine bilaterale Verteilung multipel auftretender ZOF.

Singulär auftretende ZOF zeigten eine deutliche Seitenpräferenz: 32 % wurden am rechten Ovar gefunden, 19 % am linken Ovar. Bei den verbleibenden 49 % handelte es sich um bilateral auftretende ZOF (LEIDL et al., 1979). Ähnliche Beobachtungen machte BERGER (1985), der singulär auftretende ZOF in 59,1 % der Fälle am rechten Ovar beobachtete. Gründe für eine ungleiche Verteilung sind bisher nicht bekannt.

Die weitere Entwicklung eines schon bestehenden ZOF verläuft unterschiedlich: Neben einer spontanen Regression kann es ebenso zu einer langanhaltenden Persistenz, oder einem sogenannten Turnover des ZOF kommen (COOK et al., 1990; HAMILTON et al., 1995). Bei einem Turnover erfolgt zwar eine Regression des bestehenden ZOF, aber im direkten Anschluss daran kommt es zur Bildung eines neuen ZOF (KESLER und GARVERICK, 1982), was mit einer Häufigkeit von etwa 57 % auftritt (COOK et al., 1990). Dies ist einhergehend mit SILVIA et al. (2002), die in ihrer Studie zeigten, dass 51 % der Follikel, welche über 10 mm groß sind und in Anwesenheit eines ZOF reifen, selbst zystisch entarten.

Neben den beschriebenen Zyklusstörungen durch ZOF kann auch parallel zu einem bestehenden, aber nicht mehr hormonell aktiven ZOF ein regelmäßiger Zyklus stattfinden (ROTH et al., 2012).

3.2. Definition zystischer Ovarfollikel

Es wird zwischen einer kleinzystischen und einer großzystischen Ovardegeneration unterschieden (BERGER, 1985; ZERBE et al., 1999). Als kleinzystische Ovardegeneration bezeichnet man das Auftreten vieler Tertiärfollikel meist an beiden Ovarien, wodurch die betroffenen Eierstöcke ein brombeerartiges Aussehen erhalten.

Tiere, die an einer kleinzystischen Ovardegeneration erkrankt sind, haben zumeist eine sehr schlechte Fertilitätsprognose (BERGER, 1985). Aufgrund des seltenen Auftretens dieser Erkrankung (ZERBE et al., 1999) wird hierauf nicht weiter eingegangen.

Eine einheitliche Definition der großzystischen Ovardegeneration lässt sich aufgrund unterschiedlicher Studien mit heterogenen Ergebnissen nicht geben. Synonym werden auch die Begriffe Ovarialzyste, zystischer Ovarfollikel (ZOF), ovarielle Zyste oder Ovarzystensyndrom verwendet.

Einige grundlegende Kriterien gelten jedoch als allgemeingültig: ZOF sind definiert als anovulatorische Follikel mit abgestorbener Eizelle, die in Abwesenheit eines Gelbkörpers eine erhaltene Wachstumsdynamik und Steroidgenese aufweisen (KESLER et al., 1979; KESLER und GARVERICK, 1982). Die erhaltene Steroidgenese der ZOF führt zur Einschränkung der physiologischen Ovarfunktion (GARVERICK, 1997; ZERBE und PETZL, 2007; JEENGAR et al., 2014).

Bezüglich der Größe, ab welcher ein anovulatorischer Follikel als ZOF gewertet wird, gibt es jedoch unterschiedliche Definitionen. KESLER und GARVERICK (1982) beschrieben ZOF als anovulatorische Follikel mit einem Durchmesser von mindestens 25 mm, wohingegen PETER et al. (2004) eine Größe von über 20 mm festlegten. In einer Studie von SILVIA et al. (2002) wird ab einer Größe von 17 mm von ZOF gesprochen. Die durchschnittliche Größe eines ZOF gaben ROTH et al. (2012) mit $27,2 \pm 2$ mm an, mit einer Wachstumsdynamik von $1,6 \pm 0,1$ mm pro Tag (im Vergleich zu dominanten Follikeln mit $0,8 \pm 0,2$ mm/Tag). Dies steht im Einklang mit den Beobachtungen von HAMILTON et al. (1995), die eine durchschnittliche Größe von 28 mm beschrieben. LEIDL et al. (1979) unterteilten die Größe der ZOF anhand ihres prozentualen Auftretens. So weist mit 74 % ein Großteil der ZOF eine Größe von unter 30 mm auf, Größen von über 50 mm wurden in nur 2 % der Fälle gesehen. Bei den meisten Studien handelt es sich allerdings nur um eine retrospektive Vermessung der schon vorhandenen ZOF, sodass nicht davon auszugehen ist, dass immer die Maximalgrößen gefunden wurden.

Bezüglich der Persistenz von ZOF sind variable Angaben zu finden. GARVERICK et al. (1997) beschrieben eine Persistenz von mindestens 10 Tagen, wohingegen SILVIA et al. (2002) diese auf 6 Tage reduzierten. Eine durchschnittliche Persistenz wurde von HAMILTON et al. (1995) mit 13 Tagen angegeben. Allerdings konnten in dieser Studie auch Einzelfälle mit einer Persistenz von über 40 Tagen beobachtet werden (HAMILTON et al., 1995).

Anhand morphologischer und endokrinologischer Unterschiede werden ZOF wiederum in zwei verschiedene Typen unterteilt: Die Follikel-Theka- und die Follikel-Lutein-Zyste.

Ein Übergang zwischen beiden Formen wird zum Teil als fließend angesehen, ebenso wie das Vorkommen verschiedener Formen am selben Ovar (LEIDL et al., 1979; WEBB et al., 1998; PETER et al., 2009).

3.3. Klassifizierung zystischer Ovarfollikel

Follikel-Theka-Zysten

Follikel-Theka-Zysten sind dünnwandig (Wanddicke < 3 mm) und können sowohl einzeln als auch multipel an den Ovarien auftreten (KESLER und GARVERICK, 1982). Sie produzieren wenig Progesteron, haben dafür aber eine erhaltene Östrogen-Synthese (LEIDL et al., 1979; VANHOLDER et al., 2005). Durchschnittliche Östradiol-17 β -Konzentrationen liegen in der Flüssigkeit von Follikel-Theka-Zysten bei 227 ± 42 ng/ml, wohingegen die Progesteron-Konzentrationen bei 98 ± 30 ng/ml liegen (ODORE et al., 1999). Ähnliche Konzentrationen konnte ISOBE (2007) in zystischen Ovarfollikeln mit noch erhaltener Granulosazellschicht feststellen. Die Östradiol-17 β -Gehalte lagen bei durchschnittlich 319 ng/ml, die Progesteron-Gehalte waren im Vergleich zu ODORE et al. (1999) mit 16,2 ng/ml deutlich niedriger (ISOBE, 2007).

Follikel-Theka-Zysten werden mit einem Anteil von 60-70 % wesentlich häufiger beobachtet als Follikel-Lutein-Zysten (WEBB et al., 1998).

Nach LEIDL et al. (1979) lassen sich Follikel-Theka-Zysten anhand histologischer und endokrinologischer Merkmale in drei weitere Subtypen unterteilen. Typ I Follikel-Theka-Zysten gleichen morphologisch der Struktur eines Tertiärfollikels, eine vielschichtige Granulosazellschicht ist histologisch deutlich zu erkennen. Sie zeigen keine Luteinisierungsanzeichen und weisen den höchsten Gehalt an Östrogenen in der Zystenflüssigkeit auf ($298 \pm 56,8$ ng/ml) bei gleichzeitig niedrigen Progesteron-Konzentrationen ($48 \pm 6,6$ ng/ml).

Typ II Follikel-Theka-Zysten verlieren die Vielschichtigkeit der Granulosazellen und degenerative Vorgänge überwiegen. Die Östrogen-Gehalte der Zystenflüssigkeit sind signifikant niedriger als bei Typ I ($93 \pm 28,6$ ng/ml) und, im Gegensatz zu diesen verdoppelt sich der Progesteron-Gehalt in Typ II Zysten.

Typ III Follikel-Theka-Zysten zeichnen sich durch deutliche Luteinisierungs- und Regressionsvorgänge aus. Die Östrogen-Gehalte sinken weiter ab und erreichen die niedrigsten Werte im Vergleich zu den anderen beiden Formen ($16 \pm 1,8$ ng/ml), wohingegen die Progesteron-Konzentrationen am höchsten sind ($628 \pm 53,5$ ng/ml). Als häufigste Form mit einem Vorkommen von 41 % aller Follikel-Theka-Zysten wurde Typ II beobachtet, gefolgt von Typ III mit 34 % und Typ I mit 25 % (LEIDL et al., 1979).

Eine ähnliche Einteilung nahmen auch BRAW-TAL et al. (2009) vor. Nach ihnen stellen Typ I Zysten ein frühes ZOF-Stadium dar mit einem teilweisen Verlust der Granulosazellen. In der Flüssigkeit dieses ZOF-Subtyps wurden hohe Östradiol-Konzentrationen mit knapp über 600 ng/ml gemessen, die Progesteron-Konzentrationen lagen bei ungefähr 90 ng/ml.

Teilluteinisierte Follikel-Theka-Zysten, wie sie von beiden oben aufgeführten Autoren beschrieben wurden, beobachteten ebenfalls ZERBE et al. (1999). Die Luteinisierung wurde entweder an der Basis des ZOF zum Ovargewebe hin festgestellt, oder die Wand des ZOF wies vereinzelte luteinisierte Bereiche auf (ZERBE et al., 1999).

Follikel-Lutein-Zysten

Als Follikel-Lutein-Zysten werden anovulatorische Follikel mit einer Größe von über 25 mm und einer Wanddicke über 3 mm, aufgrund der Luteinisierung der Follikelwand definiert (LEIDL et al., 1979; GRUNERT und BERCHTOLD, 1999). Sie produzieren Progesteron (BORYCZKO et al., 1995; GARVERICK, 1997; VANHOLDER et al., 2006) und weisen meist eine goldgelbe Zystenflüssigkeit auf (LEIDL et al., 1979). Der Übergang zwischen Follikel-Theka- und Follikel-Lutein-Zyste, sowie der Follikelatresie wird als fließend angesehen (GRUNERT und BERCHTOLD, 1999). Dies veranlasste BALOGH et al. (2014) dazu, nicht von Follikel-Lutein-Zysten sondern von luteinisierten Follikel-Zysten zu sprechen.

Nach ODORE et al. (1999) liegen die Progesteron-Konzentrationen in Follikel-Lutein-Zysten bei 699 ± 362 ng/ml. Die Östradiol-17 β -Konzentrationen sinken auf $18 \pm 8,4$ ng/ml ab. Wiederum vergleichbare Konzentrationen konnte ISOBE (2007) in Zysten mit nicht mehr erhaltener Granulosazellschicht messen. Die gemessenen Konzentrationen für Progesteron betrugen durchschnittlich 316 ng/ml und für Östradiol 15,4 ng/ml.

Der Anteil der Follikel-Lutein-Zysten an den ZOF liegt mit 30-42 % niedriger als der der Follikel-Theka-Zysten (GARVERICK, 1997). Nach der Studie von BRAW-TAL et al. (2009) entsprechen Follikel-Lutein-Zysten den von ihnen beschriebenen Typ II Zysten. Typ II Zysten nach BRAW-TAL et al. (2009) zeigten luteinisierte Areale, eine nur noch ein- bis zweischichtige Granulosazellschicht und wiesen mit etwa 450 ng/ml hohe Progesteron-Konzentrationen auf, bei Östradiol-Werten unter 100 ng/ml (BRAW-TAL et al., 2009). Auch die von LEIDL et al. (1979) dokumentierten Typ III Follikel-Theka-Zysten entsprechen eher der Definition der Follikel-Lutein-Zyste.

Häufig werden Follikel-Lutein-Zysten auch als Spätform der Follikel-Theka-Zysten

beschrieben, nachdem diese auf einen unbekannten Stimulus hin luteinisieren (COOK et al., 1990; GARVERICK, 1997). EINSPIANIER et al. (1993) vermuten hingegen, dass Follikel-Lutein-Zysten direkt aus präovulatorischen Follikeln entstehen, welche durch ein verfrühtes oder unzureichendes LH-Signal zwar luteinisieren, allerdings nicht ovulieren. Nach heutigem Kenntnisstand können diese Strukturen nicht allgemein hin als pathologisch dargestellt werden und müssen von physiologischen Gelbkörpern mit Höhle abgegrenzt werden. Follikel-Lutein-Zysten verhalten sich in ihrer weiteren Entwicklung entsprechend einem physiologischen Gelbkörper und bilden sich zyklusgerecht zurück (ZERBE et al., 1999; BALOGH et al., 2014). Gelbkörper mit Höhle entstehen im Gegensatz zu Follikel-Lutein-Zysten nach einer physiologischen Ovulation und haben einen unterschiedlich großen Hohlraum mit einer Wanddicke von über 3 mm (GARVERICK, 1997). Sie treten bei nicht tragenden Kühen mit einer Inzidenz von 57,1 % auf und produzieren analog zu kompakten Gelbkörper ohne Hohlraum äquivalente Mengen an Progesteron (PEREZ-MARIN, 2009). Aufgrund der ausgebliebenen Ovulation haben Follikel-Lutein-Zysten im Gegensatz zu Gelbkörpern mit Höhle keine Ovulationspapille. Histologisch wurde beobachtet, dass die steroidaktiven Zellen der luteinisierten Wand fast ausschließlich aus großen Luteinzellen bestehen (BALOGH et al., 2014).

Nicht-steroidaktive zystische Ovarfollikel

Neben den hormonell aktiven ZOF, die entweder dominierend Östradiol oder Progesteron sezernieren, werden auch nicht-steroidaktive ZOF als eigenständige Gruppe beschrieben (ROTH et al., 2012). Von BRAW-TAL et al. (2009) werden diese als Typ III Zysten beschrieben, die weder eine hohe Östradiol- noch eine hohe Progesteron-Synthese zeigten, einen vollständigen Verlust sowohl der Granulosa- als auch der Thekazellen aufwiesen und stattdessen Fasergewebe ausgebildet hatten.

Diese hormonell inaktiven ZOF entsprechen zwar den morphologischen Kriterien eines ZOF, jedoch beeinflussen sie den ovariellen Zyklus nicht und können zusammen mit einem Gelbkörper auftreten (ZERBE und PETZL, 2007; JEENGAR et al., 2014).

Es ist nicht bekannt, über welchen Mechanismus es zu dieser Form oder zum Abbau derartiger ZOF kommt, oder ob eine Rückbildung zu einer steroidaktiven ZOF-Form möglich ist.

3.4. Pathogenese zystischer Ovarfollikel

Systemische-extraovarielle Faktoren

Eine allgemein anerkannte Hypothese zur Entstehung von ZOF geht von einer hypothalamisch-hypophysär-ovariellen Dysfunktion mit multifaktorieller Ätiologie aus. Es scheinen sowohl genetische, phänotypische, als auch umweltassoziierte Faktoren bei der Bildung von ZOF eine Rolle zu spielen (VANHOLDER et al., 2006). Eine genetische Prädisposition für ZOF tritt jedoch nur mit geringer Heritabilität auf (VANHOLDER et al., 2006).

Die Störung auf der Ebene der hypothalamisch-hypophysären Achse schließt ein verändertes Muster der LH-Sekretion aus der Hypophyse ein. Nach wie vor ist umstritten, ob eine 1.) unzureichende 2.) überschüssige oder 3.) zeitlich falsche LH-Ausschüttung zum Ausbleiben der Ovulation führt und der anovulatorische Follikel bei erhaltener Wachstumsdynamik nicht atresiert, sondern sich weiter zum ZOF entwickelt (VANHOLDER et al., 2006). Aufgrund von unterschiedlichen Forschungsergebnissen und Evidenzlagen sollen im Folgenden verschiedene Hypothesen zur ZOF-Entstehung vorgestellt werden.

Die unter 1.) angegebene unzureichende LH-Sekretion aus der Hypophyse basiert auf der Annahme, dass ein gestörter Östradiol-Feedback-Mechanismus des Hypothalamus vorliegt (TODOROKI und KANEKO, 2006). Der Hypothalamus zeigt dabei eine mangelnde Reaktionsfähigkeit auf das von den heranreifenden Follikeln vermehrt sezernierte Östradiol, woraufhin die Stimulation der GnRH-Freisetzung durch Östradiol ausbleibt. Durch das fehlende GnRH unterbleibt wiederum eine für den LH-Peak ausreichende LH-Freisetzung aus der Hypophyse (KESLER et al., 1979; PETER, 2004; VANHOLDER et al., 2006).

Durch das Ausbleiben des LH-Peaks (YOSHIOKA et al., 1996; TODOROKI und KANEKO, 2006) erfolgt keine Ovulation. Das weitere Wachstum des präovulatorischen Follikels bei erhaltender intrafollikulärer Östradiol- und Inhibin A-Produktion bleibt jedoch erhalten. Durch die fortwährend hohe Östradiol- und Inhibin A-Synthese wird die FSH-Ausschüttung der Hypophyse unterdrückt. Kommt es zu einem späteren Zeitpunkt zur Regression des entstandenen ZOF, fällt die Hemmung der FSH-Sekretion weg und die Entwicklung eines neuen präovulatorischen Follikels mit nachfolgender Ovulation kann wieder stattfinden (KANEKO et al., 2002; TODOROKI und KANEKO, 2006).

Das Ausbleiben des LH-Peaks vor der ZOF-Entstehung stellten DOBSON et al. (2000) in ACTH-induzierten ZOF fest, einhergehend mit insgesamt erniedrigten LH-Pulsen. Die FSH-Konzentrationen im Blut zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren keine

Veränderungen, wohingegen die Östradiol-Konzentrationen vor einer ZOF-Bildung anstiegen (DOBSON et al., 2000). VANHOLDER et al. (2005) wiesen etwa eine Woche vor einer ZOF-Bildung ebenfalls deutlich erhöhte Serum-Östradiol-Spiegel nach.

Einen weiteren möglichen Faktor, der zu einer hypothalamischen Sekretionsstörung mit Inhibierung der LH-Ausschüttung führt, können suprabasale Progesteron-Konzentrationen darstellen.

Durch suprabasale Progesteron-Konzentrationen im Plasma bleibt die Frequenz der LH-Pulse erhalten und ist zum Teil sogar erhöht, ein LH-Peak wird jedoch inhibiert. Durch das Ausbleiben des LH-Peaks erfolgt keine Ovulation, anstelle dessen bleibt eine weitere Größenzunahme des Follikels mit anhaltender Östradiol-Synthese erhalten (STOCK und FORTUNE, 1993).

Nach SILVIA et al. (2002) weisen 66 % der Kühe, die einen ZOF hatten, suprabasale Progesteron-Konzentrationen zwischen 0,1-1 ng/ml im Blut auf. In Anwesenheit dieser Konzentrationen bildeten 75 % der Kühe erneut einen ZOF, wohingegen nur 10 % physiologisch ovulierten (SILVIA et al., 2002; HATLER et al., 2003). Eine Produktion von suprabasalen Progesteron-Konzentrationen wird in frühreifen, schon teilluteinisierten präovulatorischen Follikeln vermutet. Durch die endogene Progesteron-Produktion wird der Östradiol-induzierte LH-Peak inhibiert und die Ovulation blockiert (SHORT et al., 1979; SILVIA et al., 2002).

Im Gegensatz dazu stehen die Beobachtungen von VANHOLDER et al. (2005), die feststellten, dass nur ein sehr geringer Anteil der Tiere suprabasale Progesteron-Werte vor einer ZOF-Bildung aufwies.

Auch GÜMEN et al. (2002 und 2005) sehen das Problem der ZOF-Bildung nicht in der Anwesenheit suprabasaler Progesteron-Werte, sondern in der Abwesenheit steigender Progesteron-Konzentrationen, wie sie nach einer physiologischen Ovulation der Fall wären. Ihrer Hypothese nach benötigt der Hypothalamus den Anstieg des Progesterons, um die Reaktionsfähigkeit auf Östradiol in Form der GnRH-Freisetzung wieder herstellen zu können. Ohne ausreichend hohe endogene Progesteron-Mengen bleibt der Hypothalamus inert gegenüber Östradiol und es kommt zur ZOF-Bildung (GÜMEN et al., 2002; GÜMEN und WILTBANK, 2002; WILTBANK et al., 2002; GÜMEN und WILTBANK, 2005).

Zu der unter 2.) angegebenen überschüssigen LH-Freisetzung aus der Hypophyse zeigten sowohl COOK et al. (1991) als auch HAMILTON et al. (1995) in ihren Studien, dass die mittlere LH-Konzentration vor einer ZOF-Entwicklung höher war als bei physiologisch ovulierenden Tieren. Die erhöhten LH-Konzentrationen erklärten zudem die erhaltene

Östradiol-Produktion in den entstehenden ZOF (SILVIA et al., 2002). COOK et al. (1991) wiesen nach, dass sowohl die Frequenz der LH-Ausschüttung als auch deren Amplituden bei Tieren waren, die ZOF entwickelten, deutlich höher waren. Eine Änderung der Östradiol-17 β - und der FSH-Konzentrationen wurde hingegen nicht gefunden (COOK et al., 1991). Dies steht im Gegensatz zu HAMILTON et al. (1995), welcher auch eine Erhöhung der LH-Konzentration feststellte, allerdings einhergehend mit tendenziell erhöhten Östradiol-17 β -Konzentrationen im Plasma. Eine Abweichung der FSH-Konzentration wurde jedoch auch nicht festgestellt (HAMILTON et al., 1995). Sowohl in den Studien von COOK et al. (1991), als auch von HAMILTON et al. (1995) handelt es sich jedoch um hormonell induzierte ZOF, was einen Einfluss auf das gesamte Hormonprofil nach sich zieht. Die erhöhten LH-Konzentrationen stehen zudem im Gegensatz zu HAMPTON et al. (2003), die in ihrer Studie durch eine frequente Gabe von LH keine ZOF-Bildung induzieren konnten. Es wurde hingegen gezeigt, dass die frequente Gabe von LH die Zeitspanne zur ersten Ovulation post partum verkürzen kann (HAMPTON et al., 2003).

Eine andere Beobachtung machten KESLER et al. (1979). In ihrer Studie wurde bei Tieren, die einen ZOF entwickelten, keine Veränderung der mittleren LH-Menge beobachtet. Sie folgerten, dass nicht die LH-Menge ausschlaggebend ist, sondern bei ovulierenden Tieren ein schnellerer LH-Anstieg erfolgen muss als bei denjenigen Tieren, die einen ZOF entwickeln (KESLER et al., 1979).

Eine weitere Hypothese der ZOF-Entstehung stellten ERB et al. (1971) auf, die von einem FSH-Exzess der Hypophyse ausgehen, welcher zur Überstimulation des Follikelwachstums und so zur ZOF-Bildung führt.

Lokale-intraovarielle Faktoren

Neben einer Störung der hypothalamisch-hypophysären Achse, deren Ursache primär extraovariell begründet ist, werden zudem intraovarielle Faktoren zur Entstehung eines ZOF beschrieben. Nach dem Ausbleiben der Ovulation kommt es physiologischerweise zur Atresie des anovulatorischen Follikels. Bei der Entstehung eines ZOF wird dieser Schritt jedoch inhibiert und anstelle dessen bleibt eine Wachstumsdynamik erhalten. Die Inhibierung der Atresie wird auf Veränderungen lokaler, intraovarieller Faktoren zurückgeführt. Durch ein Missverhältnis proliferativer und degenerativer intraovarieller Prozesse persistiert der anovulatorische Follikel und es bildet sich im Weiteren ein ZOF (ISOBE, 2007; ORTEGA et al., 2015).

Insbesondere das vaskuläre System ist bei der Bildung eines ZOF starken Veränderungen

unterworfen. ZOF, die noch eine Granulosazellschicht aufweisen, haben eine höhere Gefäßdichte in den *Theca interna*-Zellen als physiologische Follikel, was zu einer verbesserten Blutversorgung des ZOF führt (ISOBE et al., 2005). Zudem ist der Von-Willebrand-Faktor in den Thekazellen von ZOF niedriger exprimiert als in physiologischen Follikeln (ISOBE, 2007). Sowohl die erhöhte Gefäßdichte als auch die Erniedrigung des Von-Willebrand-Faktors ziehen eine verlangsamte Degeneration des vaskulären Systems nach sich und somit ein verlängertes Bestehenbleiben des ZOF.

Auch das Renin-Angiotensin-System weist bei ZOF ein verändertes Expressionsmuster auf. ZOF haben eine ähnliche Rezeptordichte des Angiotensin-Rezeptors AT₂ wie Follikel im Östrus (SCHAUSER et al., 2001). Die AT₂-Rezeptordichte weist sowohl mit der Follikelgröße als auch mit der Östradiol- und Progesteron-Konzentration physiologischer Follikel eine positive Korrelation auf (NIELSEN et al., 1994). Auch die Aktivität des Angiotensin-konvertierenden-Enzyms (ACE), welches an der Umwandlung von Ang-I und -II beteiligt ist, ist in ZOF im Vergleich zu präovulatorischen Follikeln und Gelbkörpern höher. Neben dem systemischen Einfluss auf das Blutdrucksystem hat Ang-II stimulierende Effekte auf die Freisetzung von Progesteron, Östradiol und Prostaglandinen in präovulatorischen Follikeln (SCHAUSER et al., 2001). Die Veränderungen dieses Systems scheinen wiederum an der Unterdrückung degenerativer Vorgänge im Ovar beteiligt zu sein und stellen einen weiteren möglichen Pathomechanismus der Entstehung von ZOF dar.

Neben den Änderungen im Bereich des vaskulären Systems von ZOF kommt es zudem zu Veränderungen im Bereich der Steroidrezeptoren und der Steroidgenese.

Das Enzym 3 β -HSD, welches die Umwandlung von Pregnenolon zu Progesteron katalysiert, ist in ZOF 10fach höher exprimiert, als in präovulatorischen Follikeln (CALDER et al., 2001). Auch die Kapazität der Androstendion-Synthese bleibt in ZOF, im Gegensatz zu physiologischen Follikeln, erhalten (KAWATE et al., 1990).

Die Anzahl der Östradiol-Rezeptoren ist in ZOF signifikant geringer als bei physiologischen Follikeln und gleicht denen eines Gelbkörpers (ODORE et al., 1999). Dies steht im Gegensatz zu einer Studie von SALVETTI et al. (2007), die in ZOF eine erhöhte Anzahl an Östrogen-Rezeptoren nachwies (SALVETTI et al., 2007). Eine ähnliche Aussage trafen MARELLI et al. (2014) bezüglich der Dichte der Östrogen-Rezeptoren an den *Theca interna*-Zellen. Das Zusammenspiel der Östrogen-Rezeptoren reguliert unter anderem die Zellproliferation, die Apoptoserate und die Steroidgenese, was einen entscheidenden Einfluss auf die ZOF-Entstehung und deren Persistenz hat (ORTEGA et al., 2015). Auch die Androgen-Rezeptoren der Granulosazellen wurden

vermehrt exprimiert, welche wiederum mit den Östrogen-Rezeptoren positiv interagieren (ALFARO et al., 2012).

Einhergehend mit Veränderungen der Östrogen- und Androgen-Rezeptoren bestehen zudem Abweichungen in der Anzahl der LH- und FSH-Rezeptoren. KAWATE et al. (1990) zeigten, dass die Anzahl der Rezeptoren für LH in den Granulosazellen von Follikel-Theka-Zysten niedriger ist als in 12-19 mm großen Follikeln. Follikel-Lutein-Zysten zeigten hingegen die gleiche LH-Rezeptordichte an ihren *Theca interna*-Zellen wie ovulatorische Follikel (KAWATE et al., 1990). Im Gegensatz dazu ergaben Untersuchungen von CALDER et al. (2001), dass die LH-Rezeptordichte in dominanten ZOF höher ist als in physiologischen Follikeln. Dadurch könnte ein anhaltendes LH-Signal die erhaltene Wachstumsdynamik der ZOF erklären.

Die FSH-Rezeptoren werden in ZOF geringer exprimiert als in physiologischen Follikeln (KAWATE et al., 1990; MARELLI et al., 2014).

Die Veränderungen sowohl im Bereich der Steroidrezeptoren als auch der Steroidgenese, stellen einen weiteren lokalen Pathomechanismus der ZOF-Entstehung dar.

ZOF, die schon über einen längeren Zeitraum persistieren, weisen im Vergleich zu atretischen und physiologischen Follikeln eine geringere Anzahl an apoptotischen Zellen in der *Theca interna*-Schicht auf (ISOBE und YOSHIMURA, 2000). Die Verringerung der Apoptoserate wird durch verschiedene intrafollikuläre Moleküle beeinflusst. In Untersuchungen mit ACTH-induzierten ZOF war der Gehalt an FALSG, welches über die Bindung an seinen Rezeptor FAS einen Zelltod induziert, reduziert, ebenso wie die Aktivität der Caspase 3 und des BCL 2 assoziierten X Proteins (BAX). Gleichzeitig wiesen ZOF einen höheren Gehalt des antiapoptischen B-Cell Lymphom 2 Proteins (BCL 2) auf, welches die Aktivität der Caspase 3 inhibiert (SALVETTI et al., 2010). Eine lokale, intraovarielle Veränderung der Zellproliferation und -degeneration führt zum Ausbleiben einer Atresie des nicht ovulierten Follikels und zur Aufrechterhaltung des ZOF.

Im Zusammenhang mit einer ZOF-Entstehung wurde auch ein Missverhältnis im IGF-1/Insulin-System beobachtet (ROTH et al., 2012). BRAW-TAL et al. (2009) zeigten, dass in ZOF keine detektierbaren Insulin-Konzentrationen messbar waren, wohingegen sie in dominanten Follikeln um das 100fache erhöht waren. Während BRAW-TAL et al. (2009) sicherlich unterschiedliche Entwicklungsabschnitte der retrospektiv betrachteten ZOF zum Messzeitpunkt verglichen, beobachteten VANHOLDER et al. (2005) ebenfalls niedrigere Plasma-Insulinspiegel eine Woche vor einer ZOF-Bildung, im Vergleich zu

physiologisch ovulierenden Follikeln. Die Autoren benennen das Insulin als eine Komponente, die in der postpartalen negativen Energiebilanz einen begünstigenden Faktor für die ZOF-Entstehung darstellen kann.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass trotz der Vielzahl zum Teil sogar widersprüchlicher Hypothesen bisher keine exakte und allein gültige Erklärung für den Entstehungsmechanismus von ZOF beim Rind gefunden werden konnte.

4. Modelle zur Induktion zystischer Ovarfollikel

4.1. Bedarf und Anforderung eines Tier-Modells

Die Erforschung von ZOF bei der Milchkuh erweist sich aufgrund der meist nur retrospektiven Betrachtungsmöglichkeit des schon vorhandenen pathologischen Zustandes als schwierig. Bei der Diagnosestellung eines vorliegenden ZOF ist der Zeitpunkt der Entstehung, bei dem es zum Umschwung eines physiologischen zu einem pathologischen Zustand kam, im Nachhinein nicht mehr feststellbar. Ein schon bestehender ZOF kann anhand morphologischer, endokrinologischer oder biochemischer Parameter zwar zum Zeitpunkt der Diagnosestellung charakterisiert werden. Ein Rückschluss auf den zugrundeliegenden, vorher stattgefundenen Pathomechanismus ist jedoch nur noch bedingt möglich. Diese Tatsache und der Forschungsbedarf bezüglich der Pathogenese von ZOF machen die Etablierung und den Einsatz von Tier-Modellen zur Erzeugung definierter ZOF nötig. Der Vorteil eines Tier-Modells besteht darin, dass durch eine gezielte Auslenkung der Ovarfunktion zu exakten Zeitpunkten ZOF induziert werden können, welche dann weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen. Die Grundlage aller Modelle stellt die Inhibierung der physiologischen Ovulation dar. Im Folgenden soll auf unterschiedliche Modelle eingegangen werden, welche auf verschiedene Art und Weise die Ovulation unterdrücken und zur Ausbildung anovulatorischer Follikel führten. Auch wenn die weitere Entwicklung der anovulatorischen Follikel nicht bei allen Modellen bekannt ist, soll dennoch auch auf diese Modelle als möglicher Ausgangspunkt der ZOF-Entstehung eingegangen werden. Zu unterscheiden sind Modelle, die auf systemischer Ebene, über die Beeinflussung des gesamten Endokriniums arbeiten, von denen, die auf lokaler Ebene mit direkter Einflussnahme auf den präovulatorischen Follikel arbeiten. Ausnahmen stellen Modelle dar, die zwar eine direkte Einflussnahme am Ovar ausüben, die aber zur systemischen Beeinflussung des Gesamtendokriniums führen.

4.2. Modelle zur systemischen Induktion zystischer Ovarfollikel

Progesteron-basierte Modelle

DIAZ et al. (2015) induzierten bei ihrem Tier-Modell ZOF durch die Generierung suprabasaler Progesteron-Werte, welche einen ovulationsauslösenden LH-Peak inhibieren. Hierfür wurden Rindern nach einer vorangegangenen Synchronisation progesteronhaltige intravaginale Spiralen drei Tage vor der zu erwartenden Ovulation für einen Zeitraum von 5, 10 oder 15 Tagen eingesetzt. Pro Gruppe wurden 5 Tiere genutzt. Um den Progesteron-Spiegel gleichbleibend auf 2 ng/ml zu halten, wurden mehrere Spiralen nacheinander mit einem Tag Überlappung verwendet. Die Tiere wurden an Tag 5, 10 oder 15 der Progesteron-Behandlung ovariectomiert. Alle behandelten Tiere zeigten ein Ausbleiben der Ovulation und eine Persistenz des präovulatorischen Follikels mit erhaltener Wachstumsdynamik. Die persistierenden Follikel stellten sich im Ultraschall als anechogen dar, mit einer Wanddicke von unter 3 mm. Ab Tag 11 der Behandlung zeigten sie eine Größenzunahme mit einem durchschnittlichen maximalen Durchmesser von 23 ± 0.6 mm an Tag 15. Die Bildung eines *Corpus luteum* wurde während der follikulären Persistenz nicht beobachtet. Ein Anstieg der Östradiol-Konzentration im Blut wurde bis Tag 10 der Behandlung gemessen. Ein LH-Peak wurde nicht nachgewiesen. Sowohl die basale LH-Konzentration als auch die LH-Amplituden waren niedriger, jedoch mit gesteigerter Pulsfrequenz in der behandelten Gruppe im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe. Aufgrund ihrer Ergebnisse schlussfolgerten DIAZ et al., (2015), dass subluteale Progesteron-Konzentrationen entscheidend für die Pathogenese von ZOF sind. Die Autoren sprechen aber selbst von erzeugten persistierenden Follikeln mit einer Ähnlichkeit zu natürlich vorkommenden ZOF.

Das Modell von NOBLE et al. (2000) konnte in ähnlicher Weise die Entstehung von persistierenden Follikeln beziehungsweise ZOF unter dem Einfluss von weitaus niedrigeren Progesteron-Werten nachweisen. Die Anwendung halbiertes progesteronhaltiger intravaginaler Spiralen sollte niedrigere Progesteron-Werte erzeugen, äquivalent zu Progesteron-Konzentrationen wie sie durch eine stressbedingte ACTH-Ausschüttung stimuliert werden können. Hierfür wurden zyklischen Färsen nach einer vorangegangenen Brunstinduktion von Zyklustag 15-40 halbe progesteronhaltige intravaginale Spiralen eingesetzt. Die Ovarien der Rinder wurden im Folgenden täglich ultrasonographisch untersucht. Die behandelten Tiere zeigten im Gegensatz zu den Tieren der Kontrollgruppe in den meisten Fällen ein Ausbleiben der Ovulation und eine Verlängerung des Zyklus. Die persistierenden Follikel waren zwischen 40-65 Tage nachweisbar, wuchsen jedoch nur bis zu einer Größe von $16,7 \pm 1,4$ mm. In den ersten 20

Tagen der Persistenz waren die Östradiol-Konzentrationen im Plasma im Vergleich zur Kontrollgruppe höher (NOBLE et al., 2000).

Eine noch geringere und zeitlich begrenztere Progesteron-Konzentration zu Inhibierung der Ovulation setzten LEE et al. (1988) ein. Für diese Studie erfolgte eine Östrussynchronisation der Rinder durch die zweimalige Gabe von $\text{PGF}_{2\alpha}$. Den Tieren der ersten Gruppe wurden 48 Stunden nach der letzten $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gabe zweimal Progesteron im Abstand von 12 Stunden systemisch injiziert. Die Tiere der zweiten Gruppe erhielten eine einmalige Progesteron-Injektion, sobald sie erste Brunstsymptome zeigten. Bei den Tieren der ersten Gruppe zeigten 28,6 % der Rinder ein Ausbleiben der Ovulation und eine Persistenz des Follikels für 10 Tage. In der zweiten Gruppe kam es hingegen bei 71 % der Tiere zur Blockade der Ovulation und zur Ausbildung eines persistierenden Follikels. Alle Tiere der Kontrollgruppe ovulierten physiologisch (LEE et al., 1988).

Östradiol-basierte Modelle

Die Anwendung von Östradiol während des Diöstrus soll zu einer verfrühten LH-Ausschüttung beziehungsweise zur Ausschüttung unzureichender LH-Konzentrationen für die Auslösung einer Ovulation führen (NADARAJA und HANSEL, 1976). Durch die Veränderung des LH-Sekretionsmusters soll es zur ZOF-Induktion kommen.

Schon KIDDER (1954) zeigte, dass die einmalige Injektion von 100 mg Diethystilbestrol am 16. Zyklustag zur Bildung großer luteinierter ZOF führt.

Ähnlich gingen auch WILTBANK et al. (1961) in einer ihrer Studien vor, bei der zyklischen Färsen am 15. oder 16. Zyklustag eine einmalige intramuskuläre (i. m.) Injektion mit Östradiol-Valerat verabreicht wurde. Unabhängig von den genutzten Konzentrationen, welche zwischen 10-50 mg lagen, wurde in über der Hälfte der Fälle die Bildung von ZOF mit einer Größe von über 20 mm beobachtet. Die ZOF hatten eine Persistenz von mindestens einem Monat und gingen danach in eine Regression über. Bei einem Tier wurde eine Luteinisierung des ZOF erst bei chirurgischer Entnahme des Eierstocks zwei Monate nach der Östradiol-Behandlung festgestellt (WILTBANK et al., 1961).

REFSAL et al. (1987) zeigten anhand ihres Modells, dass eine einmalige Anwendung von Östradiol-17 β zur Bildung von ZOF führt. Hierfür erfolgte eine Brunstinduktion durch die Anwendung von $\text{PGF}_{2\alpha}$ bei vier Rindern. Anschließend wurden die Tiere im mittleren bis späten Diöstrus mit einer einmaligen i. m. Injektion von 10 mg Östradiol-17 β behandelt. Zur Weiterverfolgung der Ovarfunktion wurden die Eierstöcke täglich palpiert

und Blutproben zur Hormonbestimmung gewonnen. Durch die Gabe des Östradiols kam es zu einer Regression des im Diöstrus vorhandenen *Corpus luteum* und einem dem präovulatorischen LH-Peak ähnlichem LH-Anstieg. Die Hälfte der Tiere ovulierte nicht und bildete nach der Behandlung zwischen 25-35 mm große ZOF (REFSAL et al., 1987).

Ein ähnliches Modell beschrieben schon zuvor NADARAJA und HANSEL (1976): Fünf zyklischen Färsen wurde am 16. Zyklustag einmalig 5 mg Östradiol-Valerat i. m. injiziert. Alle behandelten Tiere zeigten im Folgenden einen verlängerten Zyklus von über 40 Tagen mit der Bildung dünnwandiger ZOF, welche Größen zwischen 25-30 mm erreichten. Zwei der Tiere hatten über einen längeren Zeitraum erhöhte Östradiol-Konzentrationen im Plasma. Eine Kuh zeigte wiederkehrendes nymphomanes Verhalten mit Relaxation der Beckenbänder (NADARAJA und HANSEL, 1976).

KANEKO et al. (2002) wendeten im Gegensatz zu den oben beschriebenen Modellen eine Immunisierung gegen das körpereigene Östradiol an, um die Östradiol-induzierte GnRH-Freisetzung aus dem Hypothalamus zu inhibieren. Durch den ausbleibenden GnRH-Impuls erfolgte ebenfalls eine Blockade des LH-Peaks. Hierfür wurde sechs Rindern zwei Tage nach der Gabe von PGF_{2α} ein intravenöser Bolus von 100 ml eines Östradiol-Antiserums verabreicht. Bei keinem der behandelten Tiere konnte daraufhin ein LH-Peak detektiert werden. Ebenso blieb bei allen Tieren die Ovulation aus. Die dominanten Follikel wuchsen in den folgenden 10 Tagen auf eine Größe von $21 \pm 1,5$ mm an. Fünf von sechs Tieren zeigten über die nächsten 50 Tage wiederkehrende Follikelwellen mit Follikelgrößen zwischen 20-30 mm, ähnlich eines ZOF-Turnovers. Keines der fünf Tiere ovulierte in dieser Zeit (KANEKO et al., 2002).

Auch GÜMEN und WILTBANK (2002) etablierten ein Modell auf Basis einer mehrmaligen systemischen Anwendung von Östradiol in Abwesenheit eines ovulationsfähigen Follikels. Die Anwendung von Östradiol sollte zur Freisetzung eines GnRH-/LH-Peaks führen, der in Abwesenheit eines präovulatorischen Follikels zur Bildung von ZOF führt. Hierfür wurden 14 Rindern über 7 Tage progesteronhaltige Spiralen eingesetzt. Die erste Östradiol-Injektion erfolgte drei Tage vor der Entfernung der Spirale zur Induktion einer Atresie des dominanten Follikels. Am Tag der Entfernung der Spirale wurde PGF_{2α} injiziert, um eine Luteolyse möglicher lutealer Strukturen herbeizuführen. Die zweite Östradiol-Injektion wurde einen Tag nach Entfernung der Spirale durchgeführt und diente der Induktion eines GnRH-/LH-Peaks in Abwesenheit ovulationsfähiger Follikel. Keines der Tiere hatte nach der zweiten Östradiol-Anwendung einen LH-Peak und bei 10 Tieren blieb eine Ovulation aus. Sieben der Tiere hatten ein

follikuläres Wachstum bis 20 mm, drei Tiere zeigten ein Wachstum bis 25 mm (GÜMEN und WILTBANK, 2002).

Östradiol- und Progesteron-basierte Modelle

Durch die simultane Anwendung von Östradiol und Progesteron soll es zur Blockade der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen Achse und so zur ZOF-Induktion kommen. COOK et al. (1990 und 1991) zeigten, dass die gleichzeitige Anwendung von Östradiol und Progesteron über mehrere Tage zur Inhibierung der Ovulation und in der überwiegenden Anzahl der Fälle zur Bildung von ZOF führt. Hierfür wurden Rindern ab Zyklustag 15 zweimal täglich subcutan (s. c.) Injektionen mit 15 mg Östradiol-17 β und 37,5 mg Progesteron verabreicht. Tieren der Kontrollgruppe wurde zweimal täglich s. c. Ethanol injiziert. Im Folgenden wurden die Ovarien der Tiere dreimal wöchentlich per rektaler Palpation untersucht. In der ersten Studie zeigten COOK et al. (1990), dass 16 von 23 Tieren mit diesem Behandlungsmodell ZOF entwickelten. Drei der Tiere mit ZOF-Bildung wiesen eine verlängerte Persistenz des ZOF auf, bei den restlichen 13 Tieren wurden die zu Beginn gebildeten ZOF durch neue ZOF ersetzt. In der folgenden Studie (1991) mit gleichem Behandlungsprotokoll zeigten alle behandelten Tiere erst eine statische follikuläre Phase ohne weiteres Follikelwachstum oder eine Gelbkörperbildung in einen Zeitraum von 29-41 Tagen. Acht der behandelten Tiere bildeten nach diesem Zeitraum einen ZOF mit einer Größe von über 20 mm aus. Diese Tiere hatten niedrige Progesteron-Konzentrationen (< 1 ng/ml) und keinen LH-Peak. Die LH-Frequenz und -Amplitude war bei diesen Tieren jedoch erhöht. Alle Tiere der Kontrollgruppe zeigten ein unverändertes Zyklusgeschehen (COOK et al., 1991).

Basierend auf der Studie von COOK et al. (1990) entwickelte die Arbeitsgruppe um HAMILTON et al. (1995) ebenfalls ein Modell mit multiplen Östradiol- und Progesteron-Injektionen um den weiteren Verlauf der induzierten Strukturen näher untersuchen zu können. Auch hier wurden den Rindern über einen Zeitraum von 7 Tagen sowohl 15 mg Östradiol-17 β als auch 37,5 mg Progesteron s. c. injiziert. Im Weiteren wurden die Ovarien der Tiere zweimal wöchentlich per Ultraschall untersucht. Von den 12 behandelten Tieren zeigten 7 Tiere die Ausbildung eines persistierenden Follikels mit anschließender spontaner Selbstheilung und Ovulation eines anderen Follikels. Die restlichen 5 Tiere zeigten die Bildung eines ZOF mit erhaltener Persistenz oder Turnover. Die mittlere Maximalgröße der ZOF lag bei $28 \pm 1,9$ mm (HAMILTON et al., 1995).

ACTH-basierte Modelle

Die Anwendung multipler ACTH-Injektionen hat einen suppressiven Effekt sowohl auf die GnRH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus als auch auf die FSH- und LH-Ausschüttung aus der Hypophyse. Durch den so inhibierten LH-Peak kommt es zum Ausbleiben der Ovulation und zur Erzeugung persistierender Follikel, die Charakteristika von ZOF aufweisen (DOBSON et al., 2000).

Schon LIPTRAP und MCNALLY (1976) machten sich diesen Wirkungsmechanismus zunutze, indem sie Rindern während der Follikelphase des Östrus ein- bis zweimal täglich, ACTH i. m. verabreichten. Die Rinder ovulierten nicht, sondern zeigten eine ZOF-Bildung. Die ZOF-Bildung erfolgte dabei ausschließlich, wenn die ACTH-Injektionen spätestens ab dem 16. Zyklustag durchgeführt wurden. Begannen die Injektionen erst danach, erfolgten physiologische Ovulationen. Die Plasma-Östradiol-Konzentrationen der behandelten Tiere blieben während der Persistenz der ZOF hoch, vergleichbar mit Werten, wie sie während der Entwicklung eines präovulatorischen Follikels gemessen werden. Die Atresie der ZOF wurde von einem Abfall der Östradiol-Konzentration mit gleichzeitigem Anstieg der Progesteron-Konzentration begleitet. Zudem wurde gezeigt, dass durch intrauterine Indomethacin-Infusionen die Atresie der ACTH-induzierten ZOF verhindert werden konnte. Eine Atresie setzte erst 7 Tage nach Absetzen der Indomethacin Behandlung ein. Die Autoren vermuteten, dass durch die Gabe von Indomethacin eine endometriale PGF_{2α}-Sekretion inhibiert wurde, welche eine spontane Atresie von ZOF auslösen würde (LIPTRAP und MCNALLY, 1976).

Auch REFSAL et al. (1987) etablierten ein Modell zur ZOF-Induktion durch multiple ACTH-Injektionen. Hierfür wurden Rinder im späten Diöstrus über einen Zeitraum von 10 Tagen alle 12 Stunden mit s. c. ACTH-Injektionen behandelt. Die Tiere zeigten in der Hälfte der Fälle keinen präovulatorischen LH-Peak und bildeten im Folgenden ZOF mit einer Größe zwischen 20-25 mm, die über 15 Tage persistierten. Zum Zeitpunkt der ZOF-Entstehung lagen die Progesteron-Werte im Serum zwischen 0.3-2 ng/ml (REFSAL et al., 1987).

Ähnlich wie schon REFSAL et al. (1987) entwickelten auch RIBADU et al. (1999) ein Modell zur ZOF-Erzeugung unter dem Einfluss von ACTH. Nach einer vorangegangenen Brunstinduktion mit PGF_{2α} und Östradiol wurden vier Färsen ab dem 15. Zyklustag über einen Zeitraum von sieben Tagen zweimal täglich mit 1 mg ACTH injiziert. Alle Tiere zeigten ein Ausbleiben der Ovulation und bildeten ZOF mit einer mittleren Größe von $26,8 \pm 3,7$ mm und einer Wanddicke unter 3 mm. Die Persistenz der ZOF lag zwischen 12-16 Tagen. Während der persistenten Phase wurden konstant niedrige Plasma-

Progesteron-Konzentrationen von $0,4 \pm 0,1$ ng/ml gemessen. In einem weiteren Abschnitt der Studie wurde den Tieren mit ACTH-induzierten ZOF 10 Tage nach der ZOF-Bildung eine Injektion mit 1 mg Östradiol verabreicht, um einen LH-Peak zu induzieren. Bei keinem der Tiere mit ZOF konnte im Gegensatz zu allen Kontrolltieren durch die Östradiol-Anwendung ein LH-Peak ausgelöst werden (RIBADU et al., 1999). DOBSON et al. (2000) wendeten das zuvor beschriebene Modell ebenfalls zur ZOF-Induktion an, jedoch mit abweichenden Ergebnissen. Die Hälfte der behandelten Tiere zeigte nach einem verlängerten Vorhandensein des präovulatorischen Follikels über 10 Tage eine physiologische Ovulation. Nur 50 % der behandelten Tiere entwickelten persistierende Follikel, die nach durchschnittlich $19,5 \pm 2,1$ Tagen in eine Regression übergingen. Die persistierenden Follikel zeigten bis Tag 12 eine Östradiol-Synthese. Ein Unterschied bezüglich der Größe zwischen physiologischen Follikeln in der Kontrollgruppe und den persistierenden Follikeln bestand nicht (DOBSON et al., 2000).

LH-basiertes Modell

Beruhend auf der Hypothese, dass ZOF durch ein Ausbleiben oder einen inadäquaten LH-Peak entstehen, entwickelten NADARAJA und HANSEL (1976) ein Modell, bei dem der LH-Peak durch die gezielte Anwendung eines LH-Antiserums unterdrückt wurde. Hierfür wurde 6 Färsen zu Beginn der Brunst je 10 ml bovines LH-Antiserum s. c. verabreicht. Vier der Tiere ovulierten scheinbar direkt nach der Anwendung des LH-Antiserum, eine Gelbkörperbildung wurde jedoch nicht beobachtet. Die Tiere kamen 6-10 Tage später erneut in Brunst und bildeten ZOF aus. Zwei der Tiere zeigten keinen LH-Peak nach der Anwendung des LH-Antiserums und bildeten direkt ZOF aus. Die induzierten ZOF hatten eine feste Konsistenz und eine Größe von 50-60 mm. Während der ZOF-Bildung kam es nicht zur Bildung eines Gelbkörpers, ebenso blieben die Plasma-Progesteron-Konzentrationen niedrig. Auch die Plasma-Östradiol-Konzentrationen blieben niedrig, wohingegen die Östron-Konzentrationen sporadisch erhöht waren. Die LH-Konzentrationen waren einhergehend mit den Östron-Konzentrationen ebenfalls erhöht (NADARAJA und HANSEL, 1976).

NSAID-basierte Modelle

Die Applikation von nicht-steroidalen Antiphlogistika (NSAID) führt über die Inhibierung der COX zu einem Ausbleiben des intrafollikulären Prostaglandin-Anstiegs, welcher einen Schlüsselfaktor der Ovulation darstellt (SIROIS et al., 2004).

PUGLIESI et al. (2012) zeigten mit ihrer Studie, dass die mehrmalige systemische

Anwendung des NSAID Flunixin-Meglumin zur Bildung anovulatorischer Follikel führte, die typische Charakteristika eines ZOF aufwiesen. Hierfür wurde Färsen 8 Stunden nach Beginn der frühen postlutealen Phase Flunixin-Meglumin in einer Konzentration von 2,5 mg/kg i. m. injiziert. Der Beginn der frühen postlutealen Phase wurde über die Verkleinerung des *Corpus luteum* um 25 % ab dem 14. Zyklustag definiert. Der Zeitpunkt der ersten Flunixin-Meglumin-Injektion wurde als Beginn der Behandlung mit Stunde 0 definiert. Die i. m. Injektionen erfolgten zu Stunde 0, 4, 8, 16, 24, 32 und 40. Die Ovarfunktion wurde über transrektale, ultrasonographische Untersuchungen dokumentiert. Bei 7 von 10 Tieren kam es zum Ausbleiben einer Ovulation mit einem weiteren Wachstum des präovulatorischen Follikels. Die anovulatorischen Follikel erreichten eine maximale Größe von $36,2 \pm 2,9$ mm, in Einzelfällen auch über 40 mm. Bei zwei Tieren platzten die ZOF an Tag 6 nach der ersten Flunixin-Injektion während einer rektalen Untersuchung. Bei den restlichen Tieren zeigte sich 10 Tage nach Behandlungsbeginn eine beginnende Atresie der ZOF. Eine beginnende Luteinisierung mit einer Verdickung und einer verstärkten Echogenität der Follikelwand wurde bereits 44 Stunden nach dem Ausbleiben der Ovulation festgestellt (PUGLIESI et al., 2012).

4.3. Modelle zur lokalen Induktion zystischer Ovarfollikel

NSAID-basierte Modelle

Für die lokale Anwendung von NSAIDs am präovulatorischen Follikel kamen sowohl unspezifische COX-1 und -2-Hemmer (DE SILVA und REEVES, 1985) als auch spezifische COX-2-Hemmer zum Einsatz (PETERS et al., 2004). Zu Grunde liegt hier, wie auch bei der systemischen Anwendung eines NSAID, die Inhibierung der COX und das damit verbundene Ausbleiben des intrafollikulären Prostaglandin-Anstiegs als Schlüsselfaktor für die Ovulation (SIROIS et al., 2004).

DE SILVA und REEVES (1985) zeigten, dass eine intraovarielle Injektion mit dem unspezifischen COX-1- und -2-Hemmer Indomethacin die Ovulation erfolgreich inhibiert und eine Grundlage zur Erzeugung von ZOF darstellt. Hierfür erfolgte eine Brunstinduktion bei Rindern durch die Gabe von PGF_{2α}. Sechzehn Stunden nachdem bei den Tieren eine Duldung beobachtet wurde, wurde eine intraovarielle Injektion mit 20 mg Indomethacin gelöst in 1 ml Kochsalz durchgeführt (6 Tiere). Die Anwendung erfolgte über eine hohe lumbale Laparotomie, bei der die Injektion in das ovarielle Stroma nahe der Basis des präovulatorischen Follikels durchgeführt wurde. Die Kontrolltiere erhielten entsprechend eine Injektion mit 1 ml Kochsalzlösung (18 Tiere). Bei allen mit

Indomethacin behandelten Tieren kam es zur Inhibierung der Ovulation, alle mit Kochsalz injizierten Tiere ovulierten. Zwischen Tag 3-12 nach der Injektion gewonnene anovulatorische Follikel zeigten eine glatte, runde Oberfläche mit unterschiedlich fortgeschrittener Luteinisierung (DE SILVA und REEVES, 1985).

PETERS et al. (2004) nutzen den spezifischen COX-2-Hemmer NS-398 zur Inhibierung der Ovulation. Hierfür wurden die Tiere durch ein Ovsynch-Protokoll (GnRH - 7 Tage - PGF_{2α} - 36 Stunden- GnRH) synchronisiert und zwei Stunden nach der zweiten GnRH-Injektion eine ultraschallgeleitete intrafollikuläre Injektion in den präovulatorischen Follikel mit 100 µL einer NS-398-Lösung durchgeführt. Die Injektionsmengen wurden individuell eingestellt, sodass die Endkonzentration des NS-398 in der Follikelflüssigkeit 10 µM betrug. Den Kontrolltieren wurde das gleiche Volumen einer Kochsalzlösung intrafollikulär injiziert. Eine Bestimmung der PGE₂-Konzentration in der Follikelflüssigkeit erfolgte jeweils in der Hälfte der mit NS-398 und der mit Kochsalz injizierten Follikel 24 Stunden nach der Injektion. Bei der anderen Hälfte der Tiere wurden ultrasonographische Verlaufskontrollen der Ovarien bis Tag 8 nach der Injektion durchgeführt. Die PGE₂-Konzentration in der Follikelflüssigkeit der mit NS-398 injizierten Tiere war deutlich reduziert und lag bei unter 1/7 der intrafollikulären Konzentration der Kontrolltiere. Alle Kontrolltiere ovulierten physiologisch, wohingegen in 90 % der mit NS-398 behandelten Tiere eine Ovulation ausblieb. Die anovulatorischen Follikel zeigten 48 Stunden nach der Injektion die ersten morphologischen Anzeichen einer Luteinisierung. Eine ausgeprägte Luteinisierung wurde an Tag 8 nach der Injektion beobachtet einhergehend mit Serum-Progesteron-Werten ($\geq 2,7$ ng/ml), welche von den Autoren als typisch für die Entwicklung eines funktionalen Gelbkörpers interpretiert wurden (PETERS et al., 2004).

Angiotensin-basierte Modelle

Ang-II ist ein Gewebefaktor, der eine Schlüsselposition in dem für die Aufrechterhaltung des Blutdrucks und des Wasserhaushalts zuständigen Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) einnimmt. Es ist jedoch auch vielfach beschrieben worden, dass ihm sowohl für die Angiogenese während der Ovulation, der Bildung des Gelbkörpers, der späteren Luteolyse (ACOSTA et al., 2000), als auch der Steroidgenese im dominanten Follikel (ACOSTA et al., 1999) und dem Follikelwachstum (NIELSEN et al., 1994; PORTELA et al., 2006) eine übergeordnete Bedeutung zukommt. Aus Versuchen an Kaninchen ist bekannt, dass Ang-II die für die Ovulation essentielle Prostaglandin-Produktion mit induziert (YOSHIMURA et al., 1992). Ang-II agiert über zwei

verschiedene Rezeptoren, den AT₁- und den AT₂-Rezeptor. Vor allem der AT₂-Rezeptor steht in Zusammenhang mit reproduktiven Funktionen und wird beim Rind vorrangig im dominanten Follikel exprimiert (SCHAUSER et al., 2001). Seine Expression ist sowohl mit der Follikelgröße (NIELSEN et al., 1994) als auch mit dem follikulären Östradiol-Gehalt (FERREIRA et al., 2007) positiv korreliert. Basierend auf dieser Grundlage nutzten FERREIRA et al. (2007) verschiedene Ang-II-Rezeptor-Blocker, um die Ovulation zu inhibieren. Zum Einsatz kamen der spezifische AT₂-Rezeptor-Blocker PD 123 319, der unspezifische AT₁- und AT₂-Rezeptor-Blocker Saralasin und der spezifische AT₁-Rezeptor-Blocker Lorsatan. Die verschiedenen Substanzen wurden brunstsynchronisierten Rindern über eine ultraschallgeleitete, transvaginale intrafollikuläre Injektion jeweils in den präovulatorischen Follikel verabreicht. Die finale Konzentration in der Follikelflüssigkeit lag für jede der Substanzen bei 10 µM. Follikel wurden injiziert, sobald sie eine Größe von 12 mm erreicht hatten. Die Injektionen fanden in zeitlich unterschiedlichen Abständen zu einer systemischen Anwendung eines GnRH-Analogons statt. Tiere galten als anovulatorisch, wenn innerhalb von 48 Stunden nach der GnRH-Anwendung durch eine transrektale ultrasonographische Kontrolle keine Ovulation festgestellt wurde. Die Anwendung von Lorsatan hatte keinen Einfluss auf die Ovulation, wohingegen Saralasin bei zeitgleicher Anwendung des GnRH-Analogons die Ovulation in 83,3 % der Fälle inhibierte. Die Ovulationsrate unter der Saralasin-Behandlung bei einem Injektionszeitpunkt 6 Stunden nach der GnRH-Applikation lag bei 42,9 % und bei einem Anwendungszeitpunkt 12 Stunden nach der GnRH-Applikation ovulierten alle Tiere. Ebenso senkten sowohl die Applikation von PD 123 319 alleine als auch von PD 123 319 in Kombination mit Lorsatan die Ovulationsraten signifikant (FERREIRA et al., 2007). Ultrasonographische Folgeuntersuchungen zur Dokumentation der weiteren Entwicklung der erzeugten anovulatorischen Follikel wurden jedoch nicht durchgeführt.

Lokal basierte Modelle mit systemischer Auswirkung

Im Vergleich zu Modellen, die ZOF basierend auf suprabasalen Progesteron-Werten induzieren (DIAZ et al., 2015), erarbeiteten GÜMEN et al. (2005) ein Modell, das über das Ausbleiben eines Progesteron-Anstiegs nach einer physiologischen Ovulation eine ZOF-Entstehung im Folgezyklus hervorruft. Ohne einen Progesteron-Anstieg nach der Ovulation soll der Hypothalamus für eine Östradiol-induzierte GnRH-Ausschüttung refraktär bleiben.

Für das Modell von GÜMEN und WILTBANK (2005) wurden bei 16 Rindern frische

Corpora haemorrhagica durch eine einseitige transvaginale Ovariectomie kurz nach einer zuvor erfolgten physiologischen Ovulation entnommen. Bei 8 Kontrolltieren wurde der zur Ovulation kontralaterale Eierstock ohne *Corpus haemorrhagicum* entnommen. Die Hälfte der Tiere mit entferntem *Corpus haemorrhagicum* bildete anovulatorische Follikel, die eine Größe von $25,4 \pm 1,4$ mm (20-32 mm) erreichten. Die Tiere mit anovulatorischen Follikeln hatten zwischen Tag 8-12 nach der Ovariectomie signifikant höhere Östradiol-Konzentrationen im Serum als die Kontrolltiere und die Tiere, die trotz der Entnahme des *Corpus haemorrhagicum* ovulierten. Die Progesteron-Konzentrationen im Serum waren ab Tag 5 nach der Ovariectomie bei den Kontrolltieren signifikant höher als bei den Tieren mit anovulatorischen Follikeln. Bei den Tieren mit Entnahme des *Corpus haemorrhagicum* und erfolgter Ovulation kam es zu einem verspäteten Progesteron-Anstieg ab Tag 9 nach der Ovariectomie. Die Kontrolltiere zeigten eine normale Zykluslänge mit physiologischer Ovulation (GÜMEN und WILTBANK, 2005). Ein ähnliches Vorgehen hatten bereits WHITMORE et al. (1972) beschrieben: In ihren Arbeiten wurde wiederholt der voll ausgebildete Gelbkörper an Zyklustag 13 entfernt, mit gleichzeitiger i. m. Injektion von Östradiol-17 β . In Zyklen, bei denen es zu einer ZOF-Bildung kam, wurden die betroffenen Eierstöcke per Ovariectomie am 13. Tag entnommen. Die ZOF hatten zu diesem Zeitpunkt eine Größe von 25-35 mm und eine deutlich luteinisierte Wand (WHITMORE et al., 1972).

Für ein weiteres Modell erzeugten GÜMEN et al. (2002) ZOF durch einen Östradiol-induzierten GnRH-/LH-Peak in Abwesenheit eines ovulatorischen Follikels. Hierfür wurden 7 Rinder durch die Anwendung einer progesteronhaltigen Spirale und der Gabe von PGF_{2 α} synchronisiert. Anschließend wurden alle ovulationsfähigen Follikel durch eine transvaginale Aspiration entfernt. Zwei Tage später wurde den Tieren Östradiol-Benzoeat (5 mg) i. m. injiziert. Nach der Östradiol-Gabe wurden tägliche transrektale, ultrasonographische Untersuchungen der Ovarien durchgeführt. Zwar zeigten alle Tiere nach der Gabe von Östradiol einen physiologischen LH-Peak, jedoch bildeten drei von ihnen anovulatorische Follikel aus und vier Tiere ovulierten physiologisch. Tiere mit anovulatorischen Follikeln hatten ein follikuläres Wachstum bis zu einer Größe von 25 mm, unter Ausbleiben eines Progesteron-Anstiegs. Die 4 Tiere, die physiologisch ovulierten, zeigten eine sekundäre Luteinisierung eines zuvor aspirierten Follikels und hatten einen Progesteron-Anstieg mit nachfolgendem physiologischen Zyklusgeschehen (GÜMEN et al., 2002).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass der überwiegende Anteil der Tier-Modelle

zur Induktion von ZOF beim Rind auf einer systemischen Beeinflussung des Endokriniums basiert. ZOF-Modelle, die auf einer lokalen Manipulation des Follikels beruhen und die induzierten Strukturen im weiteren Verlauf über eine längere Zeitspanne untersuchen, sind bisher wenig bekannt.

Hieraus ergibt sich das Ziel der vorliegenden Arbeit, ein Modell zur Induktion von ZOF beim Rind durch eine lokale intrafollikuläre Anwendung von COX-Inhibitoren zu erarbeiten, ohne den ovariellen Zyklus systemisch zu manipulieren.

III. INDUCTION OF CYSTIC OVARIAN FOLLICLES (COFs) IN CATTLE BY USING AN INTRAFOLLICULAR INJECTION OF INDOMETHACIN

Rebecca Lapp¹

Volker Röttgen^{1,2}

Torsten Viergutz¹, Dr. rer. nat

Joachim Weitzel¹, PD Dr. rer. nat

Andreas Vernunft¹, Dr. med. vet.

¹ Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), D-18196 Dummerstorf

² Institute of Behavioural Physiology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), D-18196 Dummerstorf

Journal of Reproduction and Development

accepted for publication on 01 December 2019

DOI: 10.1262/jrd.2019-107

—Technology Report—

Induction of cystic ovarian follicles (COFs) in cattle by using an intrafollicular injection of indomethacin

Rebecca LAPP¹⁾, Volker RÖTTGEN^{1,2)}, Torsten VIERGUTZ¹⁾, Joachim M. WEITZEL¹⁾ and Andreas VERNUNFT¹⁾

¹⁾Institute of Reproductive Biology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), D-18196 Dummerstorf, Germany

²⁾Institute of Behavioural Physiology, Leibniz Institute for Farm Animal Biology (FBN), D-18196 Dummerstorf, Germany

Abstract. The aim of this study was to establish a model to induce cystic ovarian follicles (COFs) in cattle using the cyclooxygenase inhibitor, indomethacin. Eighteen Holstein-Frisian cattle were synchronized with prostaglandin F₂α (PGF₂α) and gonadotropin-releasing hormone (GnRH). Ultrasound-guided transvaginal intrafollicular injections were performed in 23 preovulatory follicles with different concentrations of indomethacin 16 h after GnRH administration. An injection of 0.2 ml 35 μM indomethacin solution (resulting in a final concentration of 8 μg/ml in the follicular fluid) was the minimal dosage leading to COF formation. The induced COFs reached a maximum mean diameter of 36.9 ± 4.5 mm eleven days after injection. The estrous cycle was extended to 25–39 days. Luteinization was first observed 4 days after injection, accompanied by a slight increase in plasma progesterone concentration. The bioactivity of indomethacin was demonstrated by the decrease of prostaglandin E₂ in the follicular fluid of three animals. The method presented here is minimally invasive and allows for the generation of defined COFs for further investigations.

Key words: Bovine, Cyclooxygenase, Follicle injection, Ovarian cysts, Ovulation

(J. Reprod. Dev. 66: 181–188, 2020)

Reproductive disorders, especially cystic ovarian follicles (COFs) are a major problem during the post-partum period of lactating dairy cows [1]. COFs lead to prolonged calving intervals and result in increased labor costs, veterinary treatments, and a higher loss due to premature culling [2]. This contradicts the aim of sustainable agriculture and animal welfare. The incidence of COF formation is about 6–30% [1, 3]. Multiparous, lactating dairy cows are more often affected by a COF than heifers or beef cows [4]. COFs are commonly defined as anovulatory follicles, larger than 25 mm in diameter, which occur in the absence of any luteal tissue and persist longer than 10 days on one or both ovaries [5]. However, other definitions state that the cysts are between 17–20 mm in diameter and persist for a shorter duration of time [6, 7]. In most studies COFs are macroscopically and hormonally divided into follicle-theca- or luteal cysts. Roughly, follicular cysts have a thin wall and usually produce estradiol. Luteal cysts have a wall which is thicker than 3 mm and they produce substantial amounts of progesterone [7]. COFs are dynamic structures which can regress spontaneously, transform from follicular to luteal cysts, and can be replaced by new cysts or persist [4, 5, 8]. Approximately 60% of COFs developed during early post-partum period regress spontaneously [7]. Investigations into the underlying mechanisms of cyst formation in naturally oc-

curing cysts are difficult, because the developmental stage of a COF cannot be precisely determined, especially in the early stages due to the unknown time point of presumed failed ovulation. A generally accepted hypothesis for the pathogenesis of COF formation is that dysfunctions in the estradiol-mediated positive-feedback mechanism of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis lead to an aberrant, insufficient or low gonadotropin releasing hormone/luteinizing hormone (GnRH/LH) surge, accompanied by suprabasal progesterone levels [7, 9, 10]. However, studies have shown that experimentally produced suprabasal progesterone levels, successfully suppress LH secretion in cows, but only persistent follicles developed, which did not show typical cyst growth dynamics [11]. Furthermore, it is well known, that cows with COF react adequately to a GnRH signal [12]. Moreover, data have shown that high LH levels can lead to COF formation [13]. The results of further studies even suggest that the pulsatile LH signals may be necessary for cystic growth [9, 10], and that no primary dysfunction of the pituitary must exist before COF formation [14]. Apart from the systemic hormonal reasons for COF formation, there are some additional local intraovarian factors which are thought to lead to or stimulate the required conditions for COF development of anovulatory follicles [15].

Due to the major obstacle that cyst formation can only be investigated retrospectively, different *in vivo* models have been established to simulate the process of COF formation in cattle, which are more or less coherent to the hypothesized pathogenesis of COF. Most of these studies have used systemic hormonal treatments to interfere with the hypothalamic-pituitary-axis. Such models included, for instance, a prolonged supplementation of progesterone [11] or the use of systemic estradiol administration [16]. Both models successfully block ovulation and lead to the formation of anovulatory follicles,

Received: August 30, 2019

Accepted: December 1, 2019

Advanced Epub: January 27, 2020

©2020 by the Society for Reproduction and Development

Correspondence: A Vernunft (e-mail: vernunft@fbn-dummerstorf.de)

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial No Derivatives (by-nc-nd) License. (CC-BY-NC-ND 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>)

which were described as becoming cystic. Another method to create anovulatory follicles up to 23 mm in diameter, is a repeated systemic injection of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) [17]. Previous studies have focused more on a local intraovarian intervention. In this and other studies, ovulation was inhibited by the administration of different cyclooxygenase (COX) inhibitors [18–20]. The upregulation of COX enzymes, especially COX-2, and the resulting increase of prostaglandins in the preovulatory follicle is an essential factor for ovulation [21]. COX-2 upregulation in the follicle is induced by an LH surge. COX-2 increases about 18 h after human chorionic gonadotropin (hCG) or GnRH administration in cattle. The resulting ovulation occurs approximately 10 h after the COX upregulation [21]. COX inhibitors suppress the increase in prostaglandins in the preovulatory follicle and successfully block ovulation [18–20, 22], but the subsequent development of these anovulatory follicles is unclear. In these studies, the COX pathway was downregulated by specific- (NS-398) [18] or non-specific COX inhibitors (flunixin and indomethacin) [19, 20, 22] in cattle. The inhibitors were either given as a systemic treatment over several days or were administered directly into the follicle. Additionally, in humans the systemic use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (meloxicam or rofecoxib) over several days is known to have similar effects on ovulation. These treatments resulted in the development of dysfunctional, delayed ovulation, or luteinized unruptured follicles (LUF) [23–25].

The defined manipulation of a single follicle using an ultrasound guided transvaginal follicle injection in cattle is an established method, which was first described by Kot *et al.*, 1995 [26]. It has been shown, that injection through the follicular wall does not alter the follicular function. Intrafollicular injections are advantageous because they allow for local administration of inhibitors or antibodies in a certain follicle, and they allow us to study their effects on follicles without taking systemic effects into account.

The before mentioned models have presented an opportunity to manipulate and study the ovulatory process. However, to our knowledge, there have been no long-term follow up studies that characterize the subsequent development of the generated anovulatory follicles, their influence on the ovarian function, and their regression. Therefore, the aim of the study was to establish the intrafollicular injection of a COX-inhibitor as a model for COF formation in cattle. Herein, the subsequent development of the anovulatory follicles into COFs after intrafollicular injection, were characterized by morphological and endocrinal parameters.

Briefly, preovulatory follicles were produced by a synchronization protocol with an injection of prostaglandin F2alpha (PGF_{2α}) followed by an injection of GnRH 54 h later. The ovulation is expected about 28 h after the GnRH administration [21]. In a first part of the study transvaginal ultrasound guided intrafollicular injections with 0.2 ml of a 279 μM indomethacin solution were performed into the preovulatory follicles 16 h after the GnRH treatment to prevent ovulation and induce COF formation. Follow up ultrasound examinations were performed and blood samples were collected to monitor the morphological and functional development of COFs until the next occurring ovulation. In the second part of the study, decreasing concentrations of indomethacin were intrafollicularly injected to determine the lowest effective concentration which leads to COF formation. The third aspect of this study was to determine the

biochemical activity of the minimal effective dose of indomethacin as measured by the PGE₂ concentration in the follicular fluid. Therefore, PGE₂ concentrations were measured in injected and subsequently aspirated follicles as well as in control follicles.

For the first part of the study, 5 preovulatory follicles were injected with 0.2 ml of 279 μM indomethacin. The mean follicle diameter on the day of injection was 18.3 ± 0.9 mm. All follicles failed to ovulate. The mean diameter was 18.3 ± 0.9 mm 24 h after the injection. The anovulatory follicles showed a significant increase in size during the next 11 days (Fig. 1). On day 4 after injection, the mean diameter was 30.8 ± 2.8 mm. Moreover, a slight thickening of the follicular wall and an increase in vascularization (Color-Doppler mode) were observed from day 4 onwards (Fig. 2). The largest mean-diameter (36.9 ± 4.5 mm) was measured on day 11 post-injection. After day 11, the COFs decreased in size and the follicular wall grew thicker. On day 18, the mean diameter was 26.7 ± 4.5 mm and for the first time, was smaller than previous examinations (Fig. 1). As time went on, the COFs became compact and completely regressed. One COF ruptured during an ultrasonography examination on day 7. Thereafter, the COF developed into a *Corpus luteum*-like structure. The length between intrafollicular injection and regression of the COF, followed by a new ovulation and physiological *Corpus luteum* formation varied between 19–39 days. A difference in the development of COFs depending on the use of heifers or lactating cows was not observed.

Plasma progesterone and estradiol concentrations were measured in 5 animals which developed a COF after intrafollicular injection of indomethacin (Fig. 3). As expected, the concentrations of progesterone decreased significantly after PGF_{2α} injection to 0.17 ± 0.01 ng/ml on the day of GnRH injection ($P < 0.05$). Thereafter, the plasma progesterone concentrations slowly increased after the disturbed ovulation (Fig. 3). On day 7 after the injection of indomethacin, the mean progesterone concentration was 0.9 ± 0.19 ng/ml and the highest concentration of 1.08 ± 0.22 ng/ml was measured 11 days

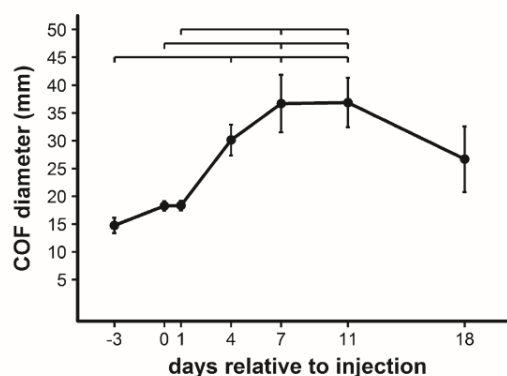


Fig. 1. Diameter development of artificially induced cystic ovarian follicles (COFs) after the injection with 0.2 ml of a 279 μM indomethacin solution 16 h after gonadotropin-releasing hormone (GnRH) administration. Day 0 is the day of intrafollicular injection. Significant increases in the diameter between the days is marked by the ticks in the line above the graphs.

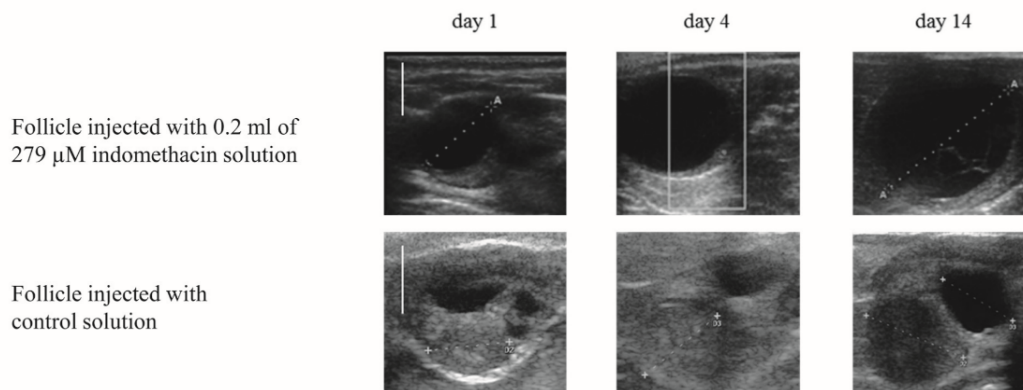


Fig. 2. Transrectal ultrasound images of ovaries from day 1, 4, and 14 after intrafollicular injection of indomethacin or control injection with ethanol solution. The white line in the first picture corresponds to 1 cm in original for all pictures in one row. The indomethacin injected follicle enlarged continuously and gained a diameter of 33.2 mm on day 14. An increase of wall thickness and vascularization (Color Doppler mode) was seen from day 4 on. The ethanol solution injected follicle ovulated and developed a *Corpus luteum* of 21 mm on day 14.

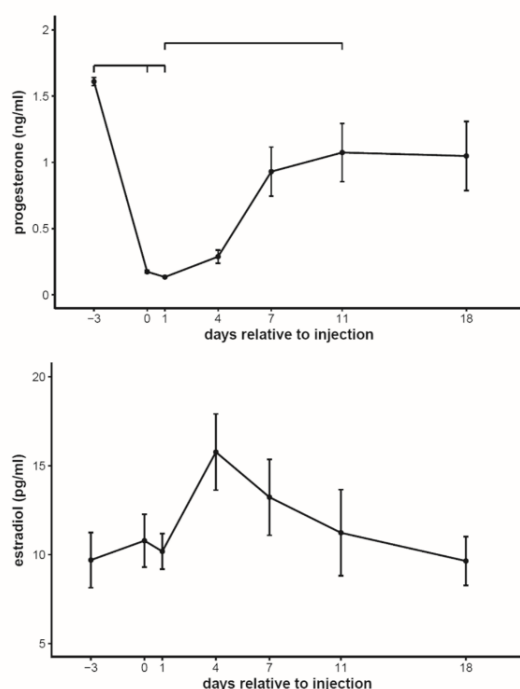


Fig. 3. Progesterone (P4) and estradiol (E2) concentrations in blood plasma are depicted for animals with an artificially induced cyst after intrafollicular injection of indomethacin. Day 0 is the day of intrafollicular injection. Significant changes of concentrations between the days are marked with the ticks in the line above the graphs.

after intrafollicular injection (Fig. 3).

The plasma estradiol concentrations showed the opposite course compared to the progesterone profile (Fig. 3). The mean estradiol concentration on the time point of injection was 10.8 ± 1.5 pg/ml (day of induced estrus), but peaked on day 4 after injection with a mean concentration of 15.8 ± 2.1 pg/ml. However, estradiol concentrations varied considerably between animals (Fig. 3). In fact, in one animal an elevation of the estradiol level in the plasma occurred not until eleven days after injection. Due to the variability no significances were observed.

As a vehicle control, 0.2 ml of a 0.5% ethanol solution was injected into 5 preovulatory follicles with a mean diameter of 16.2 ± 1.2 mm. All vehicle treated follicles ovulated within 24 h after injection and developed a *Corpus luteum* (Fig. 2). The *Corpus luteum* reached a size of 25.1 ± 1.1 mm at day 11 after injection.

For the second part of the study 0.2 ml of decreasing concentrations of indomethacin were injected into preovulatory follicles to detect the minimal effective dose for ovulation prevention (Table 1). COFs developed even after an injection of 35 µM indomethacin solution ($n = 4$ injections), whereas injections of 5 µM indomethacin solution ($n = 2$ injections) resulted in ovulations. Overall, the anovulatory follicles (later COFs) from this point, gained a mean diameter of 28.7 ± 2.9 mm 4 days after injection. The COFs that developed after the injection of 35 µM indomethacin, gained a mean diameter of 30.8 ± 3.5 mm 4 days after injection. The ovulated follicles developed a *Corpus luteum* with a mean diameter of 17.6 ± 2.3 mm on day 4.

The third aspect of this study was concerned with investigating the effect of the lowest inhibitory dose of indomethacin on the synthesis of PGE_2 . Therefore, 3 follicles were injected 16 h after GnRH administration with the minimal effective dose of indomethacin (0.2 ml at 35 µM). The follicles were aspirated 5 h later (21 hours after GnRH administration). As controls, untreated preovulatory follicles were aspirated 16 h ($n = 3$) and 21 h ($n = 5$) after the GnRH

Table 1. Administered solutions of indomethacin, and the resulting final concentrations in the follicular fluid of injected follicles, the numbers of injected and the subsequent ovulated follicles

Concentration	Final concentration	Number of injections	Ovulated follicles
279 μ M	64 μ g/ml	5	0
140 μ M	32 μ g/ml	3	0
70 μ M	16 μ g/ml	4	0
35 μ M	8 μ g/ml	4	1
5 μ M	1.14 μ g/ml	2	2

The corresponding final concentrations in the follicular fluid were calculated for the estimated average follicle diameter of 18.1 mm.

administration. A mean concentration of 2.5 ± 0.5 ng/ml PGE_2 was measured in follicles 16 h after GnRH injection, whereas in the later aspirated control follicles the concentration were 13.7 ± 6.8 ng/ml (21 h after GnRH, Fig. 4). Follicles receiving an injection of 35 μ M indomethacin solution 5 h prior to the aspiration showed the lowest concentrations of PGE_2 . Their mean PGE_2 concentration was 0.4 ± 0.1 ng/ml 21 h after the GnRH treatment (Fig. 4). Despite the obvious numerical differences between groups, the changes in the PGE_2 concentration could not be statistically secured.

Our results show that an intrafollicular injection of indomethacin successfully blocks the ovulation of preovulatory follicles and results in COF formation. Although an aberrant LH signal due to a disruption in the hypothalamus-pituitary-ovarian-axis is the most common hypothesis for COF formation, the exact pathophysiology remains unknown. In contrast to other models and the common hypothesis, the model presented here includes a GnRH induced LH surge. We show that a disruption of local intraovarian factors alone, in a preovulatory follicle is sufficient to create conditions resulting in COF formation. The anovulatory follicles retained their growth, became cystic and formed later on the situation of suprabasal P4 concentration as observed in cystic cows [7]. For several models in which disturbance of the hypothalamic-pituitary-ovarian-axis occurs, the development of only persistent follicles was described and a regression was seen after the abolishment of the administered substances [11, 17]. Comparable to the presented results, a study of Gümen *et al.* (2005) showed that COF formation after an LH surge is possible [14]. This leads to the assumption that the LH signal could be important for further growth of the anovulatory follicles. The increasing growth rates of the follicle to a cyst seen in this model will provide insight into the processes and triggering signals that cause that an unruptured follicle will develop into a cyst and not undergo atresia or persistence.

Indomethacin, a COX-1 and COX-2 inhibitor, is known to produce anovulatory follicles [18, 20, 22] and this could be confirmed in the present study. The mentioned studies performed intrafollicular injections at the time of GnRH or 2 h after GnRH administration. In this study the time point of intrafollicular injection was 14 to 16 h later. The later time point in this protocol was chosen because of the expected upregulation of COX (18 h after GnRH treatment) [21] and the plasma half-life of indomethacin (5.3 h) [27]. After successful ovulation inhibition, the anovulatory follicles of the current

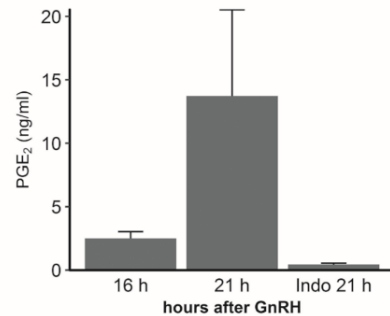


Fig. 4. Prostaglandin E_2 (PGE_2) concentrations in follicular fluids of untreated follicles 16 h and 21 h after gonadotropin-releasing hormone (GnRH) administration and in follicles 21 h after GnRH, but injected with a solution of 0.2 ml of 35 μ M indomethacin 5 h prior.

study developed into a COF within a few days. The maximum COF diameter of 36.9 ± 4.5 mm in this study is comparable to a study, which observed COF formation after longterm systemic COX inhibitor treatment (flunixin) in cows. They reported maximum diameters of 36.2 ± 2.9 mm [19]. Anovulatory follicles, which were formed with different approaches (e.g. by ACTH or prolonged progesterone treatment), remained smaller in size (20–25 mm) [11, 17]. Depending on the cyst definition, the diameter of the COFs produced in this study were comparable to naturally occurring cysts [7].

The rapid growth of COFs induced with COX inhibitors might be explained by a maintained estradiol production during the first days. Estrogen is the key-mediator in growing follicles. It inhibits apoptosis, increases proliferation in dominant follicles [28], and provides positive feedback for LH secretion [10]. While the process of follicle rupture is clearly dependent on prostanoid production [21], previous evidence shows that the steroidogenic production of a preovulatory follicle is prostanoid independent [29]. For example, the endogenous ligand for benzodiazepine receptors, the Diazepam Binding Inhibitor (DBI), stimulates *in vivo* steroidogenesis [30]. DBI upregulation in preovulatory follicles is unaffected by indomethacin and its prostaglandin reduction [29]. In this study most of the animals showed increasing plasma estradiol concentrations during the first days following injection with indomethacin, which supports this hypothesis. High variations in estradiol secretion, like in this study are known for preovulatory follicles as well as for cows with cystic ovarian follicles [31, 32]. The variations of estradiol plasma levels, as confirmed in this study, do not contradict the hypothesis above, because it was shown that cysts can contain high estradiol concentrations, which are not always reflected in the plasma [11].

In the current study, the first signs of luteinization (increase in wall thickness and vascularization) were observed at day 4 after intrafollicular injection. The initiation of luteinization might be too early in comparison to the luteinization processes described for naturally occurring cysts [1, 4]. The stimulus, which leads to the switch from persistence to luteinization in COFs without a preceding LH surge, is still unknown [33]. In this study, the observed luteinization

stagnation and the growth of the induced COFs remained until day 11 after injection which is in contrast to other studies. While anovulatory follicles induced by NS-398 or systemic flunixin administration, began to luteinize within the first 44–48 h after failed ovulation, the COFs induced using our protocol showed a prolonged period of 4 days to the beginning of luteinization. Therefore, NS-398 induced anovulatory follicles were described further as LUF [18] due to the relatively early luteinization but not as COFs. This observation is similar to studies in humans, which reported LUF development in women after the oral consumption of meloxicam over several days [24].

In this study, delayed luteinization was accompanied by a delayed increase in plasma progesterone concentrations. The progesterone concentration remained at suprabasal levels, which is the same for naturally occurring cysts [1]. Progesterone concentrations that are characteristic for a physiological *Corpus luteum* were not reached. Follicles treated with the specific COX-2 inhibitor NS-398, which were later described as LUF, reached serum progesterone levels of ≥ 2.7 ng/ml on day 8 after injection [18].

A prolonged sexual cycle was observed in 4 of 5 animals in this study. Interference of cyclicity is a known characteristic for ovarian cysts [34]. To our knowledge, no other artificial COF model has shown this unique characteristic before. Only one animal ovulated within 19 days after the indomethacin injection. However, this animal experienced a rupture of the COF due to an ultrasound examination at day 7 after injection. A rupture or a total aspiration of COF fluid is a therapeutic procedure for naturally occurring cysts allowing for a return to normal cyclicity [5, 35].

One of the aims of the development of this model was, that independent of the follicular size a fixed dose of indomethacin can be used. The initial concentration of indomethacin in this study was based on the findings of Li *et al.*, 2006 [20]. However, to go one step further, the concentration of indomethacin was reduced in a stepwise manner to obtain the minimal effective dosage, which still disturbs the ovulation. The minimal effective dosage was 25 times lower than the doses used by Li *et al.*, 2006. A reduction of the used COX inhibitor concentration could be helpful to reduce possible side effects of high COX inhibitor loads in the follicle, such as the diffusion and the interference to a nearby follicle. Whereas the concentration of indomethacin was reduced to a minimum, the expected effect on the COX pathway could still be observed. A clear sign for the preserved activity of low dose indomethacin injection was the massive reduction of PGE_2 in the follicular fluid of injected follicles compared to untreated follicles (Fig. 4). The reduction of the PGE_2 concentration due to intrafollicular COX inhibitor

administration is comparable to other studies [18, 20].

In summary, the presented COF induction protocol uses a minimally invasive procedure and results in COF formation, even after physiological follicle development and LH-surge. Although the induced COFs differ in the time point, when the first signs of luteinization were observed, they meet other clinical criteria of naturally occurring ovarian cysts in cattle regarding size, morphology, persistence and interference with cyclicity. In contrast to other models with systemic hormonal treatment, the presented artificial COF model can selectively demonstrate the manipulation of ovarian functions only by local factors. Therefore, this model is useful to gain defined samples of COFs for further investigations. This will contribute to the elucidation of the underlying endocrine and molecular mechanisms of cystic ovarian disorders.

Material and Methods

Animals

In this study 23 German Holstein heifers and 2 German Holstein cows in their first lactation underwent repeated intrafollicular injections in different experimental setups of the study. The animals were between 20 and 51 months of age and housed at the Experimental Facility for Cattle at the Leibniz Institute for Farm Animal Biology in Dummerstorf, Germany. They were fed with a need based total mixed ration *ad libitum*. Lactating cows were milked twice a day. The experimental design was approved by the federal state of Mecklenburg Western-Pomerania, Germany (LALLF M-V TSD 7221.3-1-010/12; TSD 7221.3-1-038/12).

Follicle selection and examination

Normal cycling animals in diestrus received an intramuscular injection of 2 ml PGF Veyx® forte (0.25 mg/ml Cloprostenol, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Germany) to induce luteolysis. Follow up ultrasound examinations confirmed that the *Corpus luteum* underwent regression (decrease in size and vascularization) and growth of a dominant follicle. If the follicle had grown more than one millimeter per day and showed increased vascularization of the follicular wall, it was considered as preovulatory. Animals with a preovulatory follicle and a luteolysis of the *Corpus luteum* received an intramuscular injection of 2 ml Gonavet Veyx® (50 µg/ml Gonadorelin, Veyx-Pharma GmbH, Schwarzenborn, Germany) to induce an LH surge. The presence of the preovulatory follicle was controlled again via ultrasound examination 16 h after GnRH administration shortly before intrafollicular injection (Fig. 5).

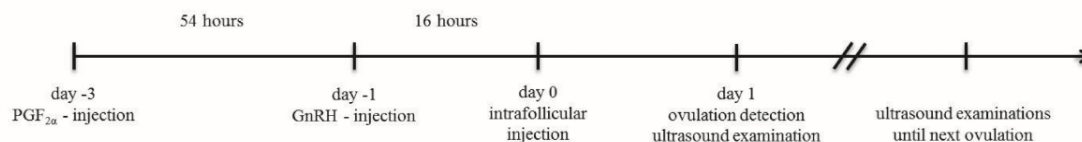


Fig. 5. Treatment protocol: Animals in diestrus received prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}) followed by a gonadotropin-releasing hormone (GnRH) injection 54 h later. Intrafollicular injections of indomethacin or vehicle control were performed 16 h after GnRH administration (day 0). First ovulation detection was performed one day after follicle injection (day 1). Semiweekly ultrasonographic examinations and sample collections followed over several weeks until the next ovulation.

Follicular injection

The ultrasound guided, transvaginal intrafollicular injection was conducted according to Vernunft *et al.*, 2013 [31]. Animals received epidural anesthesia with 5 ml Procainidol (20 mg/ml Procainhydrochlorid, WDT, Garbsen, Germany) and nervous animals were additionally sedated with 0.75 ml Xylariem (20 mg/ml Xylariemhydrochlorid, Ecuphar, Oostkamp, Belgium). The follicle injection was carried out with a custom made ovum pick-up device mounted with a 6,5 MHz sector finger-tip-probe (EUP-F331, Hitachi Medical, Tokyo, Japan) for the Picker CS 9000 ultrasound system (EUP-405, Hitachi Medical), equipped with a 25-gauge needle (Sterican needles 0.5 × 40 mm, B. Braun, Melsungen, Germany). The needle was connected to a prolongation tube and a 1 ml syringe at the outside end. The tube was filled with 0.9% saline solution (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet., B. Braun Vet Care, Melsungen, Germany) to minimize air-filled space in the system. Shortly before the follicle injection started, the injection solution was loaded retrograde into the injection system through the needle. An air bubble remained between the test and the saline solution, which ensured separation of the test and the preloaded saline solution. After cleaning the perianal region, the ovum pick-up device was placed in the vagina and fixed with one hand. The other hand fixed the ovary with the preovulatory follicle in front of the device via transrectal manipulation. The needle was pushed through the vaginal fornix into the selected follicle under ultrasound control. To decrease the risk of follicle rupture, the path of the needle should include a 3 mm bridge of ovarian tissue before entering the follicle. During the injection, the injected fluid visibly swirled around. This confirmed a successful injection (Fig. 6). After 15 min a transrectal ultrasound examination was performed to ensure that the follicle was not ruptured or leaked follicular fluid due to the previous injection.

Part 1

For the first part, 6 heifers and 2 lactating cows were divided randomly in two treatment groups. One group ($n = 5$ animals) received an intrafollicular injection of 0.2 ml of 279 μM indomethacin solution ($n = 5$ injections). Indomethacin (Indomethacin 99%, Merck KGaA, Darmstadt, Germany) was resuspended first in ethanol (ROTIPURAN® $\geq 99.8\%$, p.a., Ethylalkohol, Carl Roth GmbH+Co. KG, Karlsruhe, Germany). This solution was diluted further with physiological saline solution (Natriumchlorid, Carl Roth GmbH+Co KG, Karlsruhe, Germany) to a concentration of 279 μM indomethacin and 0.5%

ethanol solution. The control group ($n = 3$ animals, two animals used twice) received an intrafollicular injection of 0.2 ml of a 0.5% ethanol solution as vehicle control ($n = 5$ injections). Ovulation was monitored by ultrasound examination one day after injection. The absence of the injected follicle and a visible development of a *Corpus luteum* or a vascularized structure in the same region of the preovulatory follicle was considered as ovulation. Anovulatory follicles were defined as follicles that failed to ovulate within 40 h after gonadorelin injection. Follow-up transrectal ultrasound examinations of the ovaries were performed twice a week (Monday and Thursday) for the indomethacin injected group until the onset of a new sexual cycle was detected. A new sexual cycle was defined by an ovulation with a development of a *Corpus luteum* and increasing plasma progesterone levels. During the ultrasound examinations, the size and presence of vascularization around the growing COF or the *Corpus luteum* were determined.

Blood sampling and hormonal determination

Blood samples were taken from 5 animals with COF development after receiving an intrafollicular injection of 0.2 ml of 279 μM indomethacin. The samples were collected from the coccygeal vein in blood collection tubes for plasma preparation containing 1.6 mg EDTA-K/ml blood (S-Monovette® EDTA 9 ml, Sarstedt, Nuembrecht, Germany). Blood samples were taken twice a week from the beginning of the treatment protocol until the onset of the next sexual cycle. Plasma was separated and stored at -20°C . Progesterone and Estradiol-17 β were analyzed according to Schneider *et al.* (2002) [36]. A quantitative ^3H -RIA was used with a 1,2,6,7- ^3H (N) progesterone tracer (Hartmann Analytik, Braunschweig, Germany) for direct progesterone measurement. The antibody was produced by immunization of rabbits versus 11-OH-progesterone conjugate. The sensitivity of the assay was 7 pg/ml. The intra- and interassay coefficient of variation were 7.6 and 9.8%, respectively. Estradiol-17 β was measured by ^3H -RIA after extraction by ethylether. The sensitivity of the assay was 3 pg/ml. The intra- and interassay coefficient of variation were 6.9 and 9.9%, respectively.

Part 2

For the second part, 4 further decreasing concentrations of indomethacin (5 μM , 35 μM , 70 μM , 140 μM) were tested for COF induction (Table 1). The corresponding final concentrations in the follicular fluid, as presented in table 1, were calculated for the

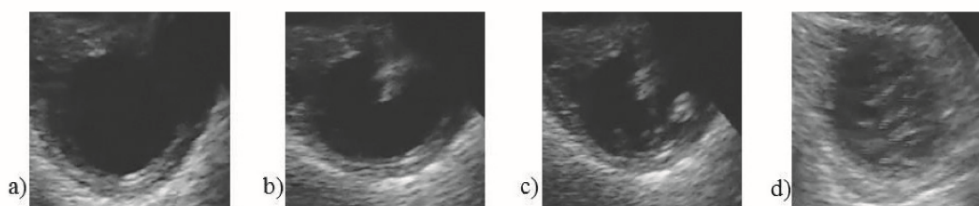


Fig. 6. Intrafollicular injection of a preovulatory follicle. The follicle is placed via rectal manipulation in front of the vaginal ultrasound probe (a), then the needle is pushed through the vaginal and follicular wall until the needle is clearly visible in the antrum (b). The substance is injected in the follicle (c). The swirling in the follicle proved the successful injection (d).

estimated average follicle diameter of 18.1 ± 0.5 mm and a volume of 3.2 ± 0.2 ml. The different concentrations of indomethacin were produced as described in part one. The injected volume remained at 0.2 ml. Nine heifers were randomly injected with different solutions ($n = 13$ injections, Table 1). After complete recovery of the physiological ovarian function three animals were used repeatedly (one animal was used two times in the group receiving a $35 \mu\text{M}$ solution of indomethacin: a second animal was used in the groups receiving a $140 \mu\text{M}$, $70 \mu\text{M}$ and a $35 \mu\text{M}$ indomethacin solution, respectively: a third animal was used in the group receiving $140 \mu\text{M}$ as well as $70 \mu\text{M}$ indomethacin solution). Follicle selection, pre-treatment, and intrafollicular injection were performed as described in part one. On the first day after intrafollicular injection, an ultrasonographic examination was performed to monitor the occurrence of an ovulation. Anovulatory follicles were examined until day 7 after injection to ensure cyst development.

Prostaglandin E_2 (PGE_2) measurement in follicular fluid

PGE_2 was measured in aspirated follicular fluids of untreated and indomethacin injected follicles in eleven heifers. Follicular fluids were sampled via ultrasound guided transvaginal follicle aspiration. Untreated follicles were either aspirated 16 h ($n = 3$) or 21 h ($n = 5$) after GnRH treatment. Treated Follicles were injected with 0.2 ml of a $35 \mu\text{M}$ indomethacin solution 16 hours after GnRH and aspirated 5 hours later (21 h after the GnRH treatment, $n = 3$). The aspirated follicular fluid was stored directly on ice and centrifuged within 5 min at $500 \times g$ for 10 min at 4°C . The cell-free supernatant was separated and stored at -20°C . PGE_2 concentration was measured in the supernatant with an ELISA (# ADI-930-001, Enzo Life Sciences, Lörrach, Germany), according to Richter *et al.*, 2015 [37]. The sensitivity for the assay was 13.4 pg/ml PGE_2 , and the intra- and inter-assay coefficients of variation were 8.9 and 3%, according to manufacturer's specifications.

Statistical analysis

Data are presented as means with their standard errors. The statistics and graphs were carried out in R statistical software (R version 3.4.1., (2017-06-30), R Core team (2017), R: A Language and Environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>. Standard errors were calculated using the package Rmisc (Ryan M. Hope (2013). Rmisc: Ryan Miscellaneous. R package version 1.5. <https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>).

The data was tested for normality with the Shapiro-Wilk test. Normal distributed data was analyzed by ANOVA (SS typ 3 for unbalanced data (PGE_2 concentration)) for repeated measurements (COF diameter, estradiol concentration). Respective multiple pairwise comparisons were calculated with Tukey-Kramer test [multicomp package: Torsten Hothorn, Frank Bretz and Peter Westfall (2008). Simultaneous inference in general parametric models. *Biometrical Journal* 50(3): 346–363]. Abnormally distributed data (progesterone concentration) was analyzed by the Friedman test. Multiple pairwise comparisons were calculated by Nemenyi test (PMCMR package: Pohlert T (2014). The Pairwise Multiple Comparison of Mean Ranks Package (PMCMR). R package, URL: <https://CRAN.R-project.org/package=PMCMR>). P-values < 0.05 were considered to be statistically

significant. Graphs were created with ggplot2 (H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009).

Acknowledgments

We would like to thank Christian Plinski and Swanhild Rodewald for their excellent work in analysis of progesterone, estradiol, and PGE_2 concentrations. Special thanks go also to Veronika Tesch and all the employees of the Experimental Facility for Cattle for their great assistance.

References

1. Vanholder T, Leroy JL, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, de Kruif A, Opsomer G. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reprod Domest Anim* 2005; **40**: 460–467. [Medline] [CrossRef]
2. Kim KD, Ki KS, Kang HG, Kim IH. Risk factors and the economic impact of ovarian cysts on reproductive performance of dairy cows in Korea. *J Reprod Dev* 2005; **51**: 491–498. [Medline] [CrossRef]
3. Kesler DJ, Garverick HA. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *J Anim Sci* 1982; **55**: 1147–1159. [Medline] [CrossRef]
4. Peter AT. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reprod Domest Anim* 2004; **39**: 1–7. [Medline] [CrossRef]
5. Jeengar K, Chaudhary V, Kumar A, Raiya S, Gaur M, Purohit GN. Ovarian cysts in dairy cows: old and new concepts for definition, diagnosis and therapy. *Anim Reprod* 2014; **11**: 63–73.
6. Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, Laranja da Fonseca LF. Ovarian follicular cysts in dairy cows: an abnormality in folliculogenesis. *Domest Anim Endocrinol* 2002; **23**: 167–177. [Medline] [CrossRef]
7. Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutr Dev* 2006; **46**: 105–119. [Medline] [CrossRef]
8. Garverick HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *J Dairy Sci* 1997; **80**: 995–1004. [Medline] [CrossRef]
9. Todoroki J, Kaneko H. Formation of follicular cysts in cattle and therapeutic effects of controlled internal drug release. *J Reprod Dev* 2006; **52**: 1–11. [Medline] [CrossRef]
10. Kaneko H, Todoroki J, Noguchi J, Kikuchi K, Mizoshita K, Kubota C, Yamakuchi H. Perturbation of estradiol-feedback control of luteinizing hormone secretion by immunoneutralization induces development of follicular cysts in cattle. *Biol Reprod* 2002; **67**: 1840–1845. [Medline] [CrossRef]
11. Diaz PU, Stangafiero ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L, Ortega HH. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: an experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology* 2015; **84**: 1149–1160. [Medline] [CrossRef]
12. Jou P, Buckrell BC, Liptrap RM, Summerlee AJ, Johnson WH. Evaluation of the effect of GnRH on follicular ovarian cysts in dairy cows using trans-rectal ultrasonography. *Theriogenology* 1999; **52**: 923–937. [Medline] [CrossRef]
13. Nadaraja R, Hansel W. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in the cow. *J Reprod Fertil* 1976; **47**: 203–208. [Medline] [CrossRef]
14. Gümen A, Wiltbank MC. Follicular cysts occur after a normal estradiol-induced GnRH/LH surge if the corpus hemorrhagicum is removed. *Reproduction* 2005; **129**: 737–745. [Medline] [CrossRef]
15. Isohe N. Follicular cysts in dairy cows. *Anim Sci J* 2007; **78**: 1–6. [CrossRef]
16. Gümen A, Sartori R, Costa FMJ, Wiltbank MC. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *J Dairy Sci* 2002; **85**: 43–50. [Medline] [CrossRef]
17. Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *J Reprod Fertil* 2000; **120**: 405–410. [Medline] [CrossRef]
18. Peters MW, Pursley JR, Smith GW. Inhibition of intrafollicular PGE_2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. *J Anim Sci* 2004; **82**: 1656–1662. [Medline] [CrossRef]
19. Pugliesi G, Khan FA, Hannan MA, Beg MA, Carvalho GR, Ginther OJ. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. *Theriogenology* 2012; **78**: 443–454. [Medline] [CrossRef]
20. Li Q, Jimenez-Krassel F, Kobayashi Y, Ireland JJ, Smith GW. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular

- matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. *Reproduction* 2006; **131**: 533–543. [Medline] [CrossRef]
21. Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Doré M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Hum Reprod Update* 2004; **10**: 373–385. [Medline] [CrossRef]
 22. De Silva M, Reeves JJ. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *J Reprod Fertil* 1985; **75**: 547–549. [Medline] [CrossRef]
 23. Pall M, Fridén BE, Brännström M. Induction of delayed follicular rupture in the human by the selective COX-2 inhibitor rofecoxib: a randomized double-blind study. *Hum Reprod* 2001; **16**: 1323–1328. [Medline] [CrossRef]
 24. Jesam C, Salvatierra AM, Schwartz JL, Fuentes A, Croxatto HB. Effect of oral administration of a continuous 18 day regimen of meloxicam on ovulation: experience of a randomized controlled trial. *Contraception* 2014; **90**: 168–173. [Medline] [CrossRef]
 25. Akil M, Amos RS, Stewart P. Infertility may sometimes be associated with NSAID consumption. *Br J Rheumatol* 1996; **35**: 76–78. [Medline] [CrossRef]
 26. Kot K, Gibbons JR, Ginther OJ. A technique for intrafollicular injection in cattle - effects of hec. *Theriogenology* 1995; **44**: 41–50. [CrossRef]
 27. Cristofol C, Valladares JE, Franquelo C, Marti G, Arboix M. Pharmacokinetics of indomethacin in cattle. *J Vet Pharmacol Ther* 1996; **19**: 72–74. [Medline] [CrossRef]
 28. Price C, Estienne A. The life and death of the dominant follicle. *Anim Reprod* 2018; **15**(Suppl 1): 680–690. [CrossRef]
 29. Li Q, Jimenez-Krassel F, Ireland JJ, Smith GW. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction* 2009; **137**: 297–307. [Medline] [CrossRef]
 30. Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 1991; **129**: 1481–1488. [Medline] [CrossRef]
 31. Vernunft A, Weitzel JM, Viergutz T. Corpus luteum development and its morphology after aspiration of a preovulatory follicle is related to size and steroid content of the follicle in dairy cows. *Vet Med (Praha)* 2013; **58**: 221–229. [CrossRef]
 32. Refsal KR, Jarrin-Maldonado JH, Nachreine RF. Basal and estradiol-induced release of gonadotropins in dairy cows with naturally occurring ovarian cysts. *Theriogenology* 1988; **30**: 679–693. [Medline] [CrossRef]
 33. Baufeld A, Vanselow J. Increasing cell plating density mimics an early post-LH stage in cultured bovine granulosa cells. *Cell Tissue Res* 2013; **354**: 869–880. [Medline] [CrossRef]
 34. Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod* 1995; **53**: 890–898. [Medline] [CrossRef]
 35. Lievaart JJ, Parlevliet JM, Dieleman SJ, Rientjes S, Bosman E, Vos PL. Transvaginal aspiration as first treatment of ovarian follicular cysts in dairy cattle under field circumstances. *Tijdschr Diergeneesk* 2006; **131**: 438–442 (In Dutch). [Medline]
 36. Schneider F, Bellmann A, Becker F, Bambang Poernomo S, Rehfeldt C, Nürnberg G, Kanitz W. Gonadotropin release in periovulatory heifers after GnRH analogs measured by two types of immunoassays. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 2002; **110**: 235–244. [Medline] [CrossRef]
 37. Richter C, Viergutz T, Schwerin M, Weitzel JM. Prostaglandin E synthase interacts with inducible heat shock protein 70 after heat stress in bovine primary dermal fibroblast cells. *Cytometry A* 2015; **87**: 61–67. [Medline] [CrossRef]

IV. DIFFERENTE WIRKUNG INTRAFOLLIKULÄR ANGEWANDTER CYCLOOXYGENASE-INHIBITOREN AUF BOVINE PRÄOVULATORISCHE FOLLIKEL

1. Hintergrund und Fragestellung

Basierend auf der Methodik des zuvor erarbeiteten Modells zur Induktion von zystischen Ovarfollikeln (ZOF) von LAPP et al. (2020) sollte in einer zweiten Arbeit die Wirkung weiterer spezifischer und unspezifischer COX-Inhibitoren untersucht werden. Ein Ziel der Studie war es, durch die Testung der Wirkung unterschiedlicher COX-Inhibitoren die Reproduzierbarkeit des publizierten Modells zu überprüfen. Ein weiteres Ziel bestand in der Abklärung, ob der Einsatz Isoform-spezifischer COX-Inhibitoren zur Spezifizierung des Modells dienen kann.

Das in der ersten Studie zur ZOF-Induktion genutzte Indomethacin gehört unter den NSAIDs zur Stoffgruppe der Essigsäurederivate und hemmt sowohl die COX-1 als auch die COX-2 (FREY und LÖSCHER, 2007). Ein weiteres NSAID, welches auch den nicht selektiven Inhibitoren der COX zugeordnet wird, ist Flunixin-Meglumin, welches im Gegensatz zu Indomethacin jedoch zur Stoffgruppe der Fenaminsäurederivate zählt (FREY und LÖSCHER, 2007).

PUGLIESI et al. (2012) konnten in ihrer Studie erfolgreich zeigen, dass die systemische Verabreichung von Flunixin-Meglumin in der postlutealen Phase zur Bildung großer anovulatorischer Follikel führte, die typische Charakteristika eines ZOF aufwiesen.

Zur Abklärung der Reproduzierbarkeit des bisher etablierten Modells wurde deshalb in Anlehnung an die Arbeit von PUGLIESI et al. (2012), der unspezifische COX-Inhibitor Flunixin-Meglumin genutzt. Neben seiner Zuordnung zu einer differentiellen Stoffgruppe (Fenaminsäure), stellt Flunixin-Meglumin zudem ein praxisübliches Tierarzneimittel dar. Die Anwendung unspezifischer Inhibitoren der COX, wie Indomethacin oder Flunixin, führt sowohl zu einer Hemmung der COX-1 als auch der COX-2 (VANE und BOTTING, 1998). Eine tiefergehende Untersuchung der zugrundeliegenden Wirkmechanismen in der ZOF-Entstehung ist somit durch den Einsatz von unspezifischen COX-Inhibitoren nur bedingt gegeben. Es ist bekannt, dass die Expression der COX-1 im präovulatorischen Follikel nur auf basalen Leveln nachweisbar ist. Ausschlaggebend für den notwendigen Anstieg der Prostaglandin-Synthese im präovulatorischen Follikel ist die Hochregulation

der COX-2 ca. 10 Stunden vor der Ovulation (SIROIS et al., 2004). Aufgrund der essentiellen Wirkung der COX-2 während des Ovulationsprozesses wurden in humanmedizinischen Studien COX-2-spezifische Inhibitoren als mögliche Kontrazeptiva zur Unterdrückung der Ovulation getestet (AKIL et al., 1996; PALL et al., 2001; JESAM et al., 2014). Der semiselektive COX-2-Inhibitor Meloxicam (HAWKEY, 2001) wurde den Probandinnen in verschiedenen Konzentrationen über einen Zeitraum von 18 Tagen verabreicht. Eine Ovulation konnte jedoch nur bei weniger als der Hälfte der Teilnehmerinnen, unabhängig von der gewählten Konzentration, unterdrückt werden (JESAM et al., 2014). In einer weiteren Studie wurde der hochselektive COX-2-Inhibitor Rofecoxib von Frauen für eine Dauer von neun aufeinander folgenden Tagen in der periovulatorischen Phase eingenommen. Eine Blockade der Ovulation durch diesen spezifischen Hemmer konnte nicht beobachtet werden, allerdings traten verspätete Ovulationen auf (PALL et al., 2001).

In der Buiatrik wurde die Wirkung von spezifischen Inhibitoren der COX-2 auf den Ovulationsprozess bisher kaum erforscht. PETERS et al. (2004) haben intrafollikuläre Injektionen des hochspezifischen COX-2-Inhibitors NS-398 in präovulatorische Follikel beschrieben. Die Studie konnte zeigen, dass die lokale Anwendung von NS-398 zur Senkung der Prostaglandin-Synthese im präovulatorischen Follikel führte und die Ovulation erfolgreich unterdrückte (PETERS et al., 2004).

Zur Spezifizierung des etablierten Modells zur Induktion von ZOF sollte deshalb auch die Anwendung spezifischer COX-2-Hemmstoffe in den weiterführenden Arbeiten untersucht werden. Hierfür wurden in einem weiteren Teil der zweiten Arbeit zum einen der semiselektive COX-2-Inhibitor Meloxicam und zum anderen der hochselektive COX-2-Inhibitor NS-398 verwendet. Mit der Verwendung von Meloxicam kann zudem erneut die Auswirkung eines häufig in der Tiermedizin genutzten Wirkstoffes auf den präovulatorischen Follikel gezeigt werden. Zur Bestätigung der biologischen Wirksamkeit der spezifischen Inhibitoren wurden, analog zu den publizierten Arbeiten, PGE₂-Konzentrationen in injizierten Follikeln bestimmt.

Im Folgenden sollen Versuchsanordnung, Durchführung und Ergebnisse des zweiten Projektteils vorgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstiere

Für die weiterführenden Arbeiten wurden insgesamt 14 Deutsche Holstein Färsen und 15 Deutsche Holstein Kühe (erste Laktation) für wiederholte, intrafollikuläre Injektionen in verschiedenen Versuchsanordnungen verwendet. Die Haltung der Tiere erfolgte unter den gleichen Bedingungen, wie in der zuvor beschriebenen Studie (LAPP et al., 2020).

2.2. Auswahl, Untersuchung und Injektion der präovulatorischen Follikel

Die hormonelle Brunstinduktion der Tiere mit PGF_{2α} und GnRH, sowie die ultrasonographische Selektion des präovulatorischen Follikels und die sich anschließende ultraschallgeleitete Injektion eines COX-Inhibitors (16 Stunden nach GnRH-Applikation) erfolgte äquivalent zu dem bereits veröffentlichten ZOF-Modell (LAPP et al., 2020). Dabei kam es zur Mehrfachnutzung einzelner Tiere, sobald sich ein physiologischer Zyklus wieder eingestellt hatte.

2.3. Applikation von unspezifischen und spezifischen COX-Inhibitoren und Kontrolllösungen

Flunixin-Meglumin, als unspezifischer COX-Inhibitor aus der Gruppe der Fenaminsäurederivate, wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen (338 µM und 56 µM) bei insgesamt 8 Tieren in präovulatorische Follikel injiziert (FLX-Gruppe). Das Fertigarzneimittel Niglumine® (Flunixin 50 mg/ml, entspricht 82,9 mg Flunixin-Meglumin, Alfavet, Neumünster, Deutschland) wurde durch die Zugabe einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet. B. Braun Vet Care; B. Braun, Melsungen, Deutschland) im Verhältnis von 1:1000 und 1:3000 verdünnt, was einer 338 µM und 56 µM flunixinhaltigen Lösung entspricht. Es wurden jeweils 7 Follikel mit 0,2 ml einer 338 µM (n = 6 Tiere) und 3 Follikel mit 0,2 ml einer 56 µM (n = 2 Tiere) flunixinhaltigen Lösung injiziert.

Als spezifische COX-2-Inhibitoren wurden für die Untersuchungen Meloxicam und NS-398 eingesetzt. Meloxicam wurde in drei verschiedenen Konzentrationen (1725 µM, 172 µM, 57 µM) bei insgesamt 11 Tieren in präovulatorische Follikel injiziert (MLX-Gruppe). Dazu erfolgte eine Verdünnung des Fertigarzneimittels Melovem® (Meloxicam 20 mg/ml; Dopharma Research B.V., Raamsdonksveer, Niederlande) durch

die Zugabe einer 0,9 %igen NaCl-Lösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet. B. Braun Vet Care; B. Braun, Melsungen, Deutschland) im Verhältnis von 1:1000, 1:333 und 1:33, was einer 1725 μM , 172 μM und 57 μM meloxicamhaltigen Injektionslösung entspricht. Es wurden jeweils 3 Follikel mit 0,2 ml der 57 μM ($n = 4$ Tiere), 5 Follikel mit der 172 μM ($n = 4$ Tiere) und 4 Follikel mit 0,2 ml der 1725 μM ($n = 3$ Tiere) meloxicamhaltigen Lösung injiziert.

Die Anwendung einer 60 μM NS-398-Lösung erfolgte bei 5 Tieren (NS-Gruppe). Für die Herstellung der 60 μM NS-398-Lösung wurde in einem ersten Schritt die Reinsubstanz N-[2-(Cyclohexyloxy)-4-Nitrophenyl] Methanesulfonamide (NS-398 > 98 %; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO > 99,7 %, Merck KGaA; Darmstadt, Deutschland) gelöst. Anschließend erfolgte eine Verdünnung mit 0,9 %iger NaCl-Lösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet. B. Braun Vet Care; B. Braun, Melsungen, Deutschland) zu der genutzten Endkonzentration, einer 60 μM NS-398-Lösung in einer 0,4 %igen DMSO-Lösung. Eine intrafollikuläre Injektion von 0,2 ml der 60 μM NS-398-Lösung erfolgte in 7 präovulatorische Follikel.

Als Kontrollen für die oben genannten Injektionen mit den verschiedenen COX-Inhibitoren, wurden parallel Injektionen mit jeweils 0,2 ml NaCl- oder einer DMSO-Lösung bei insgesamt 8 Tieren durchgeführt.

Die Injektion von 0,9 %iger NaCl-Lösung (isotonische Natriumchlorid-Lösung ad us. vet. B. Braun Vet Care; B. Braun, Melsungen, Deutschland) erfolgte in 6 präovulatorische Follikel ($n = 5$ Tiere, NaCl-Gruppe).

Zur Herstellung einer 0,4 %igen DMSO-Kontrolllösung erfolgte die Verdünnung von 100 % Dimethylsulfoxid (DMSO > 99,7 %; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) in 0,9 %igen NaCl-Lösung. Es wurden 3 Follikel mit 0,4 %iger DMSO-Lösung injiziert ($n = 3$ Tiere, DMSO-Gruppe).

2.4. Klinische Untersuchung

Eine Ovulationskontrolle erfolgte über eine transrektale Ultraschall-Untersuchung bei allen Tieren am Folgetag der Injektion. Alle Tiere, die einen ZOF gebildet hatten, wurden bis Tag 4 nach der Injektion weiter ultrasonographisch untersucht.

In der FLX-Gruppe wurden drei der Tiere, die nach der Behandlung einen ZOF gebildet hatten, für weitere 10 Tage zweimal wöchentlich ultrasonographisch untersucht.

In der MLX-Gruppe wurden zwei der Tiere, die einen ZOF gebildet hatten, ebenfalls

weiterführend über einen Zeitraum von 14 Tagen zweimal wöchentlich ultrasonographisch verfolgt.

2.5. PGE₂-Bestimmung im präovulatorischen Follikel

PGE₂ wurde in der Follikelflüssigkeit von 3 präovulatorischen Follikeln gemessen, welche zuvor mit NS-398 injiziert wurden (n = 3 Tiere). Analog zu den vorherigen Untersuchungen (LAPP et al., 2020) wurden präovulatorische Follikel 16 Stunden nach einer GnRH-Applikation mit 0,2 ml der 60 µM NS-398-Lösung injiziert. Eine transvaginale Follikelaspersion erfolgte 5 Stunden nach der Injektion von NS-398 (21 Stunden nach GnRH).

Die Bestimmung der PGE₂-Konzentrationen in den Follikelflüssigkeitsproben erfolgte analog zu dem in der vorherigen Publikation beschriebenen Ablauf mittels ELISA-Kit.

2.6. Statistische Auswertung

Eine Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler für die ZOF-Größen an Tag 4 erfolgte mittels der Statistik-Software SigmaPlot (SigmaPlot Version 11.0, from Systat Software, Inc., San Jose California USA, www.Systatsoftware.com). Für die Berechnung der Mittelwerte und Standardfehler der PGE₂-Konzentrationen wurde die Statistik-Software R (R version 3.4.1., (2017-06-30), R Core team (2017), R: A Language and Environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>) mit dem Paket Rmisc (Ryan M. Hope (2013). Rmisc: Ryan Miscellaneous. R package version 1.5. (<https://CRAN.R-project.org/package=Rmisc>) genutzt. Für die graphische Darstellung der PGE₂-Werte wurde das Paket Ggplot2 (H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2009) verwendet.

3. Ergebnisse

3.1. Effekte der injizierten Substanzen

Alle sieben Tiere, deren Follikel mit der höheren Dosis Flunixin (338 µM) injiziert wurden, zeigten ein Ausbleiben der Ovulation mit Bildung eines ZOF (FLX-Gruppe). Rinder, die hingegen mit der niedrigeren Dosis (56 µM) behandelt wurden, ovulierten physiologisch und bildeten nachfolgend einen Gelbkörper (siehe Tab. 1). Die ZOF der ultrasonographisch weiter beobachteten Tiere erreichten an Tag 4 nach der Injektion eine

durchschnittliche Größe von $30,8 \pm 1,7$ mm (siehe Tab. 2). Eine beginnende Luteinisierung, einhergehend mit einer leichten Wandverdickung (> 1 mm, aber < 3 mm) und zunehmender Vaskularisation der ZOF-Wand, wurde ebenfalls ab Tag 4 beobachtet. Die Wachstumsdynamik der induzierten ZOF blieb darüber hinaus erhalten, sodass an Tag 11 nach der Injektion ZOF-Durchmesser von über 40 mm gemessen wurden. Nach Tag 11 zeigte sich dann eine deutlich fortschreitende Luteinisierung der ZOF mit Zunahmen der Wanddicken auf über 3 mm, gefolgt von einer Regression.

Tiere, denen Meloxicam in präovulatorische Follikel injiziert wurde (MLX-Gruppe), zeigten ausschließlich unter der Anwendung der höchsten Meloxicam-Konzentration ($1725 \mu\text{M}$) ein Ausbleiben der Ovulation jedoch nur bei 3 von 4 Follikeln (siehe Tab. 1). Die niedrigeren Meloxicam-Konzentrationen ($172 \mu\text{M}$, $57 \mu\text{M}$) führten bei den behandelten Tieren hingegen zu keiner offensichtlichen Störung der Ovarfunktion. Sie ovulierten im physiologischen Zeitfenster und zeigten bei der ersten Kontrolluntersuchung am Tag nach der Injektion einen Gelbkörper in Ausbildung. Die Tiere mit anovulatorischen Follikeln wiesen nachfolgend eine ZOF-Bildung auf. Die anovulatorischen Follikel in der MLX-Gruppe ($1725 \mu\text{M}$) zeigten eine erhaltene Wachstumsdynamik und erreichten eine durchschnittliche Größe von $28,3 \pm 4,1$ mm an Tag 4 nach der Injektion (siehe Tab. 2). Ähnlich den ZOF in der FLX-Gruppe, zeigten die ZOF in der MLX-Gruppe zu diesem Zeitpunkt auch erste Anzeichen einer beginnenden Luteinisierung. Die weitere Entwicklung der mit Meloxicam induzierten ZOF zeigte sich bisher heterogen. Das Wachstum der ZOF blieb von Tag 11 bis 13 nach der intrafollikulären Injektion erhalten, mit Erreichen einer maximalen Größe von 29 bis 37,5 mm. Eine deutlich fortschreitende Luteinisierung der ZOF mit einer

Wanddicke von über 3 mm war bei einem Tier schon an Tag 6 nach der Injektion sichtbar, bei einem zweiten Tier hingegen erst nach Tag 11. Mit beginnender Regressionsphase der induzierten ZOF zeigte ein Tier ein ZOF-Turnover mit der Bildung weiterer ZOF über einen Zeitraum von mehreren Wochen.

Im Gegensatz zu den Tieren der MLX- und der FLX-Gruppe ovulierten alle Tiere, denen der hochselektive COX-2-Inhibitor NS-398 in den präovulatorischen Follikel injiziert wurde (NS-Gruppe). Eine Steigerung der Dosis in der NS-Gruppe (0,2 ml einer $60 \mu\text{M}$ Lösung) war aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Stoffes bei gleichbleibendem Volumen nicht mehr möglich. Tiere, die mit den Kontrolllösungen DMSO oder NaCl behandelt wurden, zeigten im Folgenden alle eine physiologische

Ovulation und Gelbkörperbildung.

Tabelle 1: Ovulationsinhibierung durch eingesetzte COX-Inhibitoren

Wirkstoff	Konzentration	Injizierte Follikel	Ovulierte Follikel
Meloxicam	57 µM	3	3
Meloxicam	172 µM	5	5
Meloxicam	1725 µM	4	1
Flunixin	56 µM	3	3
Flunixin	338 µM	7	0
NS-398	60 µM	7	7
NaCl	0,9 %	6	6
DMSO	0,4 %	3	3

Übersicht der verwendeten COX-Hemmer und Kontrollsubstanzen, sowie deren angewendete Konzentrationen. Angegeben sind neben dem verwendeten Wirkstoff die Anzahl der jeweils injizierten präovulatorischen Follikel und die Anzahl der davon ovulierten Follikel.

Tabelle 2: Größenentwicklung induzierter ZOF

Wirkstoff	Konzentration	ZOF-Größe an Tag 4 (mm)
Indomethacin	279 µM	30,8 ± 2,8
Flunixin	338 µM	30,8 ± 1,7
Meloxicam	1725 µM	28,3 ± 4,1

ZOF-Größe an Tag 4 nach der Injektion, eingeteilt anhand des verwendeten Wirkstoffs und dessen Konzentration in der Injektionslösung (Indomethacin n = 5, Flunixin n = 4, Meloxicam n = 3). Zum Vergleich wurden die Ergebnisse von Indomethacin-Injektionen mit aufgeführt, die den vorausgegangenen Studien entnommen wurden (LAPP et al. 2020).

3.2. Senkung der PGE₂-Konzentration im präovulatorischen Follikel

Da alle sieben Tiere ovulierten, denen der hochselektive COX-2-Inhibitor NS-398 in den präovulatorischen Follikel injiziert wurde (siehe Tab. 1), wurde die Wirksamkeit der eingesetzten NS-398-Lösung auf die intrafollikuläre Prostaglandin-Synthese überprüft. Hierfür wurden drei Follikel 5 Stunden nach einer Injektion von 0,2 ml 60 µM NS-398 aspiriert und ihre PGE₂-Gehalte bestimmt. In NS-398-injizierten Follikeln, betrugen die

PGE₂-Konzentrationen 5 Stunden nach der Injektion (somit 21 Stunden nach GnRH-Gabe) $0,3 \pm 0,2$ ng/ml. Damit war die Reduktion der PGE₂-Gehalte vergleichbar mit derer in Follikeln, die mit einer ZOF-induzierenden Indomethacin-Dosis injiziert wurden (siehe Abb.1).

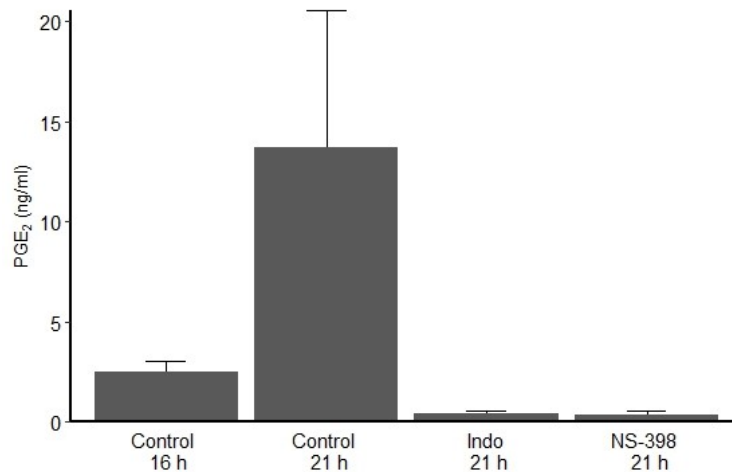


Abbildung 1: PGE₂-Bestimmung im präovulatorischen Follikel

PGE₂-Konzentrationen in Follikelflüssigkeiten präovulatorischer Follikel, 16 (n = 3) und 21 Stunden (n = 5) nach einer GnRH-Anwendung. Im Vergleich dazu, PGE₂-Konzentrationen in Follikelflüssigkeiten von Follikeln 21 Stunden nach GnRH-Anwendung, denen 5 Stunden zuvor 0,2 ml einer 35 µM Indomethacin-Lösung (n = 3) oder einer 60 µM NS-398-Lösung (n = 3) injiziert worden waren (Ergebnisse aus der vorangegangenen Studie (LAPP et al. 2020) sind einbezogen).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sowohl die intrafollikuläre Injektion von Flunixin als auch von Meloxicam zur Induktion von ZOF geeignet ist. Zu beachten ist jedoch, dass für die Inhibierung der Ovulation durch die Anwendung des semiselektiven COX-2-Inhibitors Meloxicam sehr hohe Konzentrationen des Wirkstoffes benötigt werden. In derart hohen Dosen inhibiert Meloxicam jedoch sowohl die COX-2 als auch die COX-1. Der hochspezifische COX-2-Inhibitor NS-398 scheint anhand der bisherigen Ergebnisse hingegen für die Induktion von ZOF nicht geeignet zu sein, obwohl NS-398 im Follikel eine inhibierende Wirkung auf die PGE₂-Synthese entfaltet, die der von Indomethacin äquivalent ist.

Hierauf soll in der folgenden übergreifenden Diskussion detailliert eingegangen werden.

V. ÜBERGREIFENDE DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, ein Modell für die nicht-systemische Induktion zystischer Ovarfollikel (ZOF) bei Rindern zu erarbeiten, welches auf einer Injektion von COX-Inhibitoren in den präovulatorischen Follikel basiert. In einer ersten Studie sollte die intrafollikuläre Injektion des COX-Hemmers Indomethacin in präovulatorische Follikel als Modell für eine lokale Induktion von ZOF bei Rindern etabliert werden (ZOF-Modell). In einer zweiten Studie sollte die Wirkung weiterer unspezifischer und Isoform-spezifischer COX-Inhibitoren zu Induktion von ZOF hinsichtlich der Reproduzierbarkeit und einer Spezifizierung des zuvor erarbeiteten Modells untersucht werden.

Zur Belegung der Reproduzierbarkeit des erarbeiteten Modells wurde ein weiterer unspezifischer COX-1- und -2-Hemmer mit äquivalenter biologischer Wirkung, aber Zugehörigkeit zu einer anderen Stoffgruppe angewandt. Das hierfür genutzte Flunixin gehört im Gegensatz zu Indomethacin nicht zu den Essigsäurederivaten, sondern zu den Fenaminsäurederivaten (FREY und LÖSCHER, 2007). Aufgrund der Hochregulation der COX-2 im präovulatorischen Follikel und der nur basalen COX-1-Expression (SIROIS et al., 2004) erfolgte zudem eine Überprüfung der Wirksamkeit spezifischer COX-2-Inhibitoren. Hierfür kamen der semiselektive COX-2-Hemmer Meloxicam sowie der hochspezifische COX-2-Hemmer NS-398 zum Einsatz.

Die eigenen Arbeiten zur Entwicklung eines ZOF-Modells auf Basis einer lokal begrenzten Auslenkung im Follikel zeigten, dass eine intrafollikuläre Injektion des nicht selektiven COX-Inhibitors Indomethacin in präovulatorische Follikel erfolgreich zur Unterdrückung der Ovulation und zur Bildung von ZOF beim Rind führt (LAPP et al., 2020). Die Reproduzierbarkeit des erarbeiteten Modells wurde durch den Einsatz von Flunixin, welches eine äquivalente Wirkung zur ZOF-Induktion wie Indomethacin zeigte, grundsätzlich bestätigt. Die zur Spezifizierung des Modells eingesetzten Isoform-spezifischen COX-Inhibitoren zeigten hingegen eine differente Wirkung. Im Gegensatz zu Indomethacin und Flunixin führte der semiselektive COX-2-Inhibitor Meloxicam nur in vergleichsweise sehr hohen Konzentrationen zur Blockade der Ovulation und zur Entstehung von ZOF. Bei Verwendung des hochspezifischen COX-2-Inhibitors NS-398 wurde die Ovulation nicht verhindert, und es kam zu einer physiologischen Gelbkörperbildung.

Durch das hier vorgestellte Modell wurde somit gezeigt, dass eine spezifische, lokal wirksame Störung direkt am präovulatorischen Follikel die physiologischen Vorgänge so auslenken kann, dass die Ovulation verhindert wird, das Wachstum des Follikels jedoch erhalten bleibt und sich im Weiteren ein ZOF bildet. Die weitere Entwicklung der durch die verschiedenen Wirkstoffe induzierten ZOF zeigte sich einheitlich. Sowohl durch Indomethacin als auch durch Flunixin und Meloxicam induzierte ZOF wuchsen in Abwesenheit einer Gelbkörperbildung auf eine Größe von über 25 mm heran, wie es typischerweise von natürlich vorkommenden ZOF bekannt ist (VANHOLDER et al., 2005). Nach Erreichen der maximalen Durchmesser waren die artifiziellen ZOF zudem an der Ausprägung suprabasaler Progesteron-Werte beteiligt. Auch dies ist ein charakteristisches Merkmal von natürlich vorkommenden ZOF (STOCK und FORTUNE, 1993; SILVIA et al., 2002; VANHOLDER et al., 2005).

Im Folgenden soll in einem ersten Abschnitt auf die klinischen Auswirkungen der induzierten ZOF hinsichtlich ihrer erhaltenen Steroidgenese, ihrer Luteinisierung und der durch sie hervorgerufenen Zyklusverlängerung eingegangen werden. Des Weiteren soll das erarbeitete Modell als solches in Bezug auf die Methodik und die angewendeten Wirkstoffe näher beleuchtet werden. Abschließend soll zudem diskutiert werden, warum es zu einer unterschiedlichen Wirksamkeit der verschiedenen COX-Inhibitoren bezüglich der Ovulationsinhibition und der Induktion von ZOF kommt.

1. Klinische Effekte der induzierten zystischen Ovarfollikel

1.1. Fortbestehendes Wachstum durch LH-Signal

Die induzierten ZOF der eigenen Arbeiten beruhen auf einer rein lokalen Manipulation des präovulatorischen Follikels nach einem vorangegangenen LH-Peak.

Eine Entstehung von ZOF basierend auf einer lokalen Veränderung intrafollikulärer Faktoren wurde schon von ISOBE (2007) in Betracht gezogen. Laut ISOBE (2007) muss es zu einer Veränderung lokaler Faktoren im präovulatorischen Follikel kommen, die eine direkte Atresie nach dem Ausbleiben der Ovulation verhindern. Ein Missverhältnis zwischen degenerativen und proliferativen Vorgängen im Follikel inhibiert somit eine direkte Regression des anovulatorischen Follikels. Anstelle dessen bleibt seine Wachstumsdynamik und Steroidgenese erhalten und es bildet sich im Weiteren ein ZOF (ISOBE, 2007; ORTEGA et al., 2015).

Der Hypothese, dass es sich bei der Entstehung von ZOF um eine reine Störung

intrafollikulärer Faktoren handelt, steht die Hypothese einer systemischen Störung der hypothalamisch-hypophysär-gonadalen Achse gegenüber, die mit Veränderungen des LH-Signals einhergeht (VANHOLDER et al., 2006). Im Gegensatz zu der Hypothese eines gestörten LH-Signals wurden die ZOF in den hier vorgestellten Arbeiten nach dem Auftreten eines GnRH-induzierten LH-Peaks erzeugt. Die induzierten ZOF bildeten sich somit trotz eines physiologischen LH-Signals ohne vorherige Auslenkung der hypothalamisch-hypophysären Achse.

Dies legt die Vermutung nahe, dass ein vorhandenes LH-Signal sogar eines der ausschlaggebenden Wachstumssignale bei der ZOF-Entstehung sein könnte. Eine vergleichbare Wachstumsdynamik wie bei den hier mit COX-Inhibitoren erzeugten ZOF, wurde nicht bei Studien beobachtet, die auf eine systemische Auslenkung der hypothalamisch-hypophysären Achse zur ZOF-Induktion abzielten. Systemisch ansetzende ZOF-Modelle, die über eine Anwendung verlängerter Progesteron-Gaben oder eine mehrmalige Applikation von ACTH arbeiten, führen zu einer Störung des Endokriniums mit Veränderung der LH-Signalkaskade. Die dabei erzeugten anovulatorischen Follikel zeigten nur in wenigen Fällen ein Wachstum, welches über den allgemein für ZOF definierten Schwellenwert von 25 mm hinausging. So inhibierten sowohl DOBSON et al. (2000) durch multiple ACTH-Injektionen als auch NOBLE et al. (2000) durch eine verlängerte Gabe von Progesteron erfolgreich die Ovulation bei Rindern. Es bildeten sich jedoch lediglich persistierende Follikel, die nicht über das Maß eines präovulatorischen Follikels hinauswuchsen. Nur in der Studie von RIBADU et al. (1999) wurden durch multiple ACTH-Injektionen ZOF mit einem Durchmesser von über 26 mm erzeugt.

Bei dem von DIAZ et al. (2015) etablierten ZOF-Modell, welches durch eine verlängerte Anwendung von Progesteron die Ovulation inhibierte, wurden Größenzunahmen der persistierenden Follikel auf über 23 mm festgestellt. Berücksichtigt man unter diesem Kriterium die Definition von PETER et al. (2004), die anovulatorische Follikel ab einer Größe von 20 mm als ZOF charakterisiert, so kann bei diesem Modell durchaus von einer ZOF-Induktion gesprochen werden.

Lediglich die simultane Anwendung von Östrogenen und Progesteron erzeugte ZOF, die einen Durchmesser von durchschnittlich 28 mm erreichten (HAMILTON et al., 1995). Auffällig ist jedoch, dass bei keinem der zuvor angesprochenen systemisch-hormonell basierten Modelle Größenzunahmen der anovulatorischen Follikel beschrieben wurden, wie sie sowohl bei der systemischen als auch der lokalen Anwendung von COX-Inhibitoren beobachtet wurden (PUGLIESI et al., 2012; LAPP et al., 2020). ZOF, die

durch eine systemische Anwendung von Flunixin induziert wurden, wuchsen auf Durchmesser von 36 bis 40 mm heran (PUGLIESI et al., 2012). Dies steht in Einklang mit den eigenen Arbeiten: Die durch intrafollikuläre Injektionen mit Flunixin erzeugten ZOF zeigten an Tag 4 Größen von durchschnittlich 30,7 mm mit einem maximalen Durchmesser von über 40 mm weitere 7 Tage später. Ähnliche Größenzunahmen wurden bei den mit Indomethacin erzeugten ZOF (30 mm an Tag 4) beobachtet. Sie erreichten maximale Größen von 37 mm an Tag 11. Die durch Meloxicam induzierten ZOF zeigten langsamere, aber vergleichbare Wachstumsraten und maßen an Tag 4 durchschnittlich 28,3 mm. Bei einzelnen Tieren wurden nach der Anwendung von Meloxicam auch ZOF mit einem Durchmesser von 37 mm beobachtet. Die hier beschriebenen induzierten ZOF entstanden nach einem LH-Peak.

Eine Ausnahme bei den systemisch wirkenden ZOF-Modellen stellen Modelle dar die durch eine systemische Östradiol-Injektion eine LH-Freisetzung vor der ZOF-Entstehung induzierten. Die hierbei entstandenen ZOF hatten vergleichbare Größen. So maßen REFSAL et al. (1987) ZOF mit Größen von bis zu 35 mm nach einer einmaligen, systemischen Injektion eines Östradiol-Analogons und daraus resultierender LH-Freisetzung. Ähnliche Größen bei artifiziellen ZOF beobachteten zudem schon NADARAJA und HANSEL (1976), die ebenfalls durch eine einmalige Östradiol-Injektion am 16. Zyklustag ZOF erzeugten. Es lässt sich vermuten, dass die bei diesen Modellen beobachteten Größenzunahmen ebenfalls auf eine vorangegangene LH-Freisetzung zurückzuführen sind.

Einen weiteren Anhaltspunkt für eine LH-abhängige erhaltene Wachstumsdynamik eines ZOF erbrachten CALDER et al. (2001) durch den Nachweis erhöhter LH-Rezeptor-Gehalte in dominanten ZOF. Die hier diskutierten Abhängigkeiten vom LH-Signal stehen jedoch klar im Gegensatz zu den allgemein anerkannten Hypothesen zur ZOF-Entwicklung, die eine Abwesenheit eines adäquaten LH-Signals als grundlegend vermuten (KESLER et al., 1979; VANHOLDER et al., 2006; PETER et al., 2009).

1.2. Fortbestehende Östradiol-Synthese

Die induzierten ZOF der eigenen Arbeiten zeigten während ihrer anfänglichen Wachstumsphase eine erhaltene Östradiol-Synthese. Diese kann jedoch nicht unabhängig von der LH-Signalkaskade betrachtet werden. Das Zusammenspiel beider Hormone scheint hierbei ausschlaggebend für den Erhalt des Wachstums des anovulatorischen Follikels zu sein.

So übt LH einen stimulierenden Einfluss auf die intrafollikuläre Östradiol-Synthese aus,

wie es ebenfalls für die Wachstumsphase dominanter Follikel bekannt ist (COOK et al., 1991; HAMILTON et al., 1995). Hierbei stellt Östradiol einen der wichtigsten Schlüsselmediatoren für die Proliferation der Granulosazellen bei gleichzeitiger Inhibierung der Apoptose dar (ENGELHARDT et al., 2010; PRICE und ESTIENNE, 2018). In den eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass bei Tieren mit Indomethacin-induzierten ZOF die Plasma-Östradiol-Konzentrationen über die ersten Tage der ZOF-Entstehung im Durchschnitt erhöht blieben. Dies spricht für eine erhaltende Östradiol-Produktion in den sich bildenden ZOF. Die anhaltende Östradiol-Synthese hat wiederum zur Folge, dass eine über FALSG und FGF-9 induzierte Apoptose im Follikel inhibiert und so eine vorzeitige Atresie verhindert wird (QUIRK et al., 2006; PORTELA et al., 2015). Das Wachstum der induzierten ZOF ist somit über einen längeren Zeitraum möglich. Gleichzeitig führt Östradiol über einen positiven Feedback-Mechanismus zur Freisetzung von LH aus der Hypophyse (KANEKO et al., 2002). Das freigesetzte LH kann wiederum an die in ZOF vermehrt ausgebildeten LH-Rezeptoren binden (CALDER et al., 2001) und stimuliert so die Östradiol-Synthese erneut. Das Wachstum der ZOF wird somit durch das Zusammenspiel der intrafollikulären Östradiol-Synthese, einhergehend mit einer basalen LH-Freisetzung aufrechterhalten, vergleichbar mit den Vorgängen im dominanten Follikel.

In den eigenen Arbeiten wurden bei den Tieren mit Indomethacin-erzeugten ZOF hohe Varianzen der Östradiol-Konzentrationen im Plasma nachgewiesen. Diese starken Streuungen scheinen jedoch charakteristisch für Rinder mit ZOF zu sein (REFSAL et al., 1988; ODORE et al., 1999). Zum einen variieren bekannterweise sowohl Progesteron- als auch Östradiol-Konzentrationen im Blut, zum anderen werden intrazystische Hormongehalte nicht immer im Blut widerspiegelt (REFSAL et al., 1988; ODORE et al., 1999). So zeigten ODORE et al. (1999), dass die Serum-Östradiol-Konzentrationen bei Tieren mit ZOF insgesamt niedriger waren als bei Rindern mit physiologischen Follikeln. Obwohl bei ODORE et al. (1999) Follikel-Theka-Zysten ein Vielfaches der Östradiol-Konzentration eines präovulatorischen Follikels aufwiesen, waren die Serumkonzentrationen für Östradiol bei den Tieren mit physiologischen Follikeln dennoch mehr als doppelt so hoch (ODORE et al., 1999). Dies spricht dafür, dass trotz der in den eigenen Arbeiten gemessenen hohen Varianzen der Östradiol-Konzentrationen im Plasma hohe Östradiol-Gehalte in den induzierten ZOF anzunehmen sind.

In den eigenen Arbeiten wurden erhöhte Plasma-Östradiol-Konzentrationen während der

ersten Tage der ZOF-Entstehung gemessen. Diese erhöhten Konzentrationen wurden in ähnlicher Ausprägung in Studien nachgewiesen, die ZOF bei Rindern über eine systemisch-hormonelle Anwendung induzierten. So maßen DIAZ et al. (2015) trotz der Generierung suprabasaler Progesteron-Werte durch eine verlängerte Anwendung von progesteronhaltigen Spiralen einen Anstieg der Serum-Östradiol-Konzentration mit Höchstwerten an Tag 10 einer follikulären Persistenz. Der Anstieg des Östradiols war bei DIAZ et al. (2015) einhergehend mit einer Erhöhung der LH-Puls-Frequenz. Die Autoren folgerten daraus, wie auch schon für die eigenen Arbeiten angenommen, einen direkten Zusammenhang zwischen einer erhaltenen Wachstumsdynamik des Follikels und einer verlängerten Östradiol-Sezernierung. Die Östradiol-Sezernierung wurde auf eine erhöhte Syntheseleistung aus den wachsenden, persistierenden Follikeln und derer steigenden Anzahl an steroidaktiven Zellen zurückgeführt. Das Absinken der Östradiol-Werte erfolgte zeitgleich mit einer deutlichen morphologischen Veränderung der persistierenden Follikel (DIAZ et al., 2015).

Ein Erhalt der intrafollikulären Östradiol-Synthese konnte ebenfalls bei ACTH-induzierten ZOF nachgewiesen werden. Dies führte bis zum Einsetzen einer Regression zu erhöhten Plasma-Östradiol-Konzentrationen, welche vergleichbar mit Konzentrationen während einer präovulatorischen Phase waren (LIPTRAP und MCNALLY, 1976). Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen, hormonell induzierten ZOF (LIPTRAP und MCNALLY, 1976; DIAZ et al., 2015) wurden in den eigenen Arbeiten bei den mit Indomethacin induzierten ZOF die durchschnittlich höchsten Plasma-Östradiol-Konzentrationen bereits am vierten Tag nach der Inhibierung der Ovulation erreicht. Das folgende Absinken der Östradiol-Konzentrationen wurde ähnlich zu DIAZ et al. (2015) einhergehend mit ultrasonographisch sichtbaren Veränderungen wie einer beginnenden Zunahme der Wanddicke und der Durchblutung des ZOF beobachtet.

Für den Zeitraum der frühen ZOF-Bildung zeigten die mit Indomethacin, Flunixin und Meloxicam induzierten ZOF charakteristische Merkmale natürlich vorkommender ZOF. Die artifiziellen ZOF hatten eine dünne Wand (< 3 mm, ultrasonographisch gemessen) ohne Luteinisierungsprozesse, entwickelten Größen von über 25 mm in Abwesenheit eines Gelbkörpers und synthetisierten Östrogene wie es auch von natürlich vorkommenden Follikel-Theka-Zysten beschrieben wird (LEIDL et al., 1979; ODORE et al., 1999; VANHOLDER et al., 2006).

1.3. Luteinisierungsvorgänge

Eine Luteinisierung der in den eigenen Arbeiten erzeugten ZOF wurde ultrasonographisch vier Tage nach der intrafollikulären Injektion der verschiedenen COX-Inhibitoren sichtbar. Das Wachstum der induzierten ZOF blieb jedoch für eine weitere Woche erhalten.

Die schon im präovulatorischen Follikel beginnende Luteinisierung kurz vor der Ovulation wird bekannterweise durch einen LH-Peak mediert. Die hier beginnende Luteinisierung der induzierten ZOF scheint jedoch nicht mehr auf den über 4 Tage vorher stattgefundenen LH-Peak zurückzuführen zu sein. Es muss sich hierbei um eine sekundäre Luteinisierung handeln, welche unabhängig von einem LH-Peak ist. Der auslösende Faktor für solch eine Luteinisierung ist bisher jedoch unklar. Das Phänomen der sekundären Luteinisierung von Granulosazellen ohne vorangegangenen LH-Peak ist auch aus Zellkultursystemen mit bovinen Granulosazellen bekannt. Hierbei konnte beobachtet werden, dass vermutlich die Zelldichte des Systems ein frühes Stadium der Luteinisierung stimuliert. Der zugrundeliegende Mechanismus konnte jedoch nicht genauer identifiziert werden (BAUFELD und VANSELOW, 2013).

Die in den eigenen Studien beobachtete einsetzende, aber dann stagnierende Luteinisierung war bei allen induzierten ZOF in ähnlicher Ausprägung nachweisbar. Die ersten ultrasonographisch darstellbaren Anzeichen einer Luteinisierung wurden ab Tag 4 nach der intrafollikulären Injektion beobachtet. Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Studien. So beobachteten PETERS et al. (2004) bei bovinen anovulatorischen Follikeln, die durch eine intrafollikuläre Injektion des hochspezifischen COX-2-Inhibitors NS-398 erzeugt wurden, schon 48 Stunden nach Ausbleiben der Ovulation eine beginnende Luteinisierung. Die Serum-Progesteron-Konzentrationen erreichten in der Studie von PETERS et al. (2004) an Tag 8 Werte von $> 2,7$ ng/ml, wie sie für die Entwicklung eines physiologischen Gelbkörpers charakteristisch sind. Aufgrund der früh einsetzenden Luteinisierung und den physiologischen Progesteron-Gehalten sprechen PETERS et al. (2004) nicht von einer ZOF-Induktion, sondern der Entstehung sogenannter luteinisierender nicht ovulierter Follikel (LUFs). LUFs sind definitionsgemäß kleiner als 25 mm, weisen im Vergleich zu Gelbkörpern mit Höhle jedoch ein größeres Lumen auf und sind umgeben von einer luteinisierten Follikelwand (BALOGH et al., 2014). Das Auftreten von LUFs bei der Anwendung von NSAIDs ist auch aus der Humanmedizin bekannt. Bei einer mehrtägigen oralen Einnahme des semiselektiven COX-2-Inhibitors Meloxicam im periovulatorischen Zeitraum wurden bei 36 % der Probandinnen anovulatorische Follikel und die Entstehung von LUFs

beobachtet (JESAM et al., 2014). Die in den eigenen Arbeiten mit Meloxicam injizierten Follikel zeigten im Gegensatz zu den genannten Studien keine Ausbildung von LUFs. Eine ebenfalls vergleichbar früh einsetzende Luteinisierung von artifiziellen ZOF wurde in der Arbeit von PUGLIESI et al. (2012) beobachtet. Die dort mit systemischer Flunixin-Anwendung induzierten ZOF zeigten die ersten ultrasonographischen Anzeichen einer Luteinisierung mit zunehmender Wanddicke und Echogenität schon 44 Stunden nach Ausbleiben der Ovulation. Eine strukturelle Regression der mit dem unspezifischen COX-Inhibitor Flunixin erzeugten ZOF wurde von PUGLIESI et al. (2012) ab Tag 10 der Persistenz beobachtet. Dies steht im Einklang mit der Entwicklung der artifiziellen ZOF der eigenen Arbeiten. Eine strukturelle Regression der induzierten ZOF, unabhängig des injizierten Wirkstoffes, trat ebenfalls um den elften Tag nach der intrafollikulären Injektion ein.

Die Luteinisierungsvorgänge der induzierten ZOF, wie sie in den eigenen Arbeiten unabhängig des zuvor eingesetzten COX-Inhibitors mit fortschreitender Intensität sichtbar wurden, sind auch von natürlich vorkommenden ZOF bekannt (WEBB et al., 1998; VANHOLDER et al., 2005; PETER et al., 2009; BALOGH et al., 2014). Aufgrund dessen werden Follikel-Lutein-Zysten häufig als Spätform der Follikel-Theka-Zysten beschrieben. BALOGH et al. (2014) präferieren hierbei die Bezeichnung der luteinisierten Follikelzyste. Diese Bezeichnung macht zum einen den Ausgangszustand des ZOF deutlicher und stellt zum anderen die Follikel-Lutein-Zyste nicht als eigenständige Pathologie dar. In der weiteren Entwicklung verhalten sich stark luteinisierte ZOF ähnlich eines *Corpus luteum* (ZOLDAG et al., 1986). Auch dieser Entwicklungsschritt konnte in den vorliegenden Arbeiten anhand morphologischer Kriterien nachvollzogen werden. Die induzierten ZOF zeigten während der Luteinisierungsvorgänge erst die charakteristischen Merkmale einer Follikel-Lutein-Zyste, beziehungsweise einer luteinisierten Follikelzyste, mit einer verdickten Follikelwand und einer dominanten zentralen Höhle. Im weiteren Verlauf wurden die Strukturen zunehmend kompakter bis hin zur kompletten Regression mit dem Beginn eines neuen Zyklus.

1.4. Bildung suprabasaler Progesteron-Werte

Die Tiere mit Indomethacin-induzierten ZOF zeigten bis zum vierten Tag nach der intrafollikulären Injektion erhöhte Östradiol-Konzentrationen im Blut. Nach dem vierten Tag kam es zum Abfall der Östradiol- und zum Anstieg der Progesteron-Konzentration auf suprabasale Werte.

Der Anstieg der Progesteron-Konzentration erfolgte zeitgleich mit einer beginnenden Luteinisierung der induzierten ZOF. Trotz einer Bildung suprabasaler Progesteron-Werte blieb ein Wachstum der ZOF mit Erreichen der maximalen Durchmesser an Tag 11 erhalten. Suprabasale Progesteron-Werte sind ebenfalls von natürlich vorkommenden ZOF bekannt. So wiesen VANHOLDER et al. (2005) in ihrer Arbeit in über der Hälfte der Fälle zwischen Tag 1-17 nach der Entstehung eines ZOF suprabasale Progesteron-Werte nach. Der Anstieg der Progesteron-Werte wurde ebenfalls einhergehend mit einer beginnenden Luteinisierung der bestehenden ZOF beobachtet. Lediglich bei zwei von sechs Tieren wurden suprabasale Progesteron-Werte vor der Entstehung eines ZOF gemessen. Diese Beobachtung ließ die Autoren folgern, dass suprabasale Progesteron-Werte nicht als primär auslösender Faktor der ZOF-Entstehung gewertet werden können (VANHOLDER et al., 2005). Dies steht in Einklang mit HATLER et al. (2003), die bei 66 % der Rinder mit schon bestehenden ZOF suprabasale Progesteron-Werte nachgewiesen hatten. HATLER et al. (2003) sahen die suprabasalen Progesteron-Werte unter anderem als Auslöser für ein Turnover der ZOF: Follikel, die in Anwesenheit eines ZOF und suprabasalen Progesteron-Werten heranwuchsen, entwickelten sich selbst in 75 % der Fälle zu ZOF (HATLER et al., 2003). Dieser auch bei natürlich vorkommenden ZOF bekannte Prozess des Turnovers (SILVIA et al., 2002) wurde ebenfalls bei den mit Meloxicam induzierten ZOF der eigenen Arbeiten beobachtet. Mit dem Abbau des induzierten ZOF kam es nicht zur Ovulation des nächsten präovulatorischen Follikels, sondern zur Ausbildung weiterer ZOF über mehrere Wochen. Zusammenfassend lassen die Ergebnisse der Studien von VANHOLDER et al. (2005) und HATLER et al. (2003), einhergehend mit den Resultaten der eigenen Arbeiten, die Vermutung zu, dass suprabasale Progesteron-Werte nicht immer als primäre Ursache der ZOF-Entstehung zu werten sind, sondern wahrscheinlicher sekundär zum Erhalt bestehender ZOF und zur Bildung neuer ZOF beitragen.

Ähnlich zu den Ergebnissen der vorliegenden Studie machten auch ESPEY et al. (1994) bei Ratten und Kaninchen die Beobachtung, dass die Anwendung von Indomethacin zwar die Ovulation inhibiert, aber eine später einsetzende Luteinisierung begleitet von einer steigenden Progesteron-Synthese nicht verhindert wird. Ein Erklärungsansatz kann bei PRICE und ESTIENNE (2018) gefunden werden, die eine Prostaglandin-unabhängige Progesteron-Synthese über das Diazepam Bindungs-Inhibitor Peptid (DBI) beschrieben. Die DBI-Konzentrationen steigen 12 Stunden nach einer mit GnRH induzierten Ovulation in den Granulosa- und Thekazellen des bovinen präovulatorischen Follikels um das Fünffache an (LI et al., 2009). DBI stimuliert durch seine Bindung an den

Benzodiazepin-Rezeptor der mitochondrialen Membran der Steroidzellen die Freisetzung von Cholesterol und somit die Bildung von Pregnenolon (BESMAN et al., 1989; PAPADOPOULOS et al., 1991), wodurch die Progesteron-Produktion aufrechterhalten wird. Weiterführend könnte hier auch eine Erklärung für die Bildung suprabasaler Progesteron-Werte bei Rindern mit ZOF gesehen werden. Die DBI-vermittelte Progesteron-Synthese sichert die Ausschüttung basaler Progesteron-Mengen. Ohne den additiven Effekt des präovulatorisch gebildeten PGE₂ kommt es allerdings nicht zur Ausbildung von Progesteron-Konzentrationen wie sie für einen physiologischen Gelbkörper charakteristisch wäre.

Darüber hinaus stellen suprabasale Progesteron-Werte eine Erklärung für das noch nach dem vierten Tag beobachtete Wachstum der induzierten ZOF in den eigenen Studien dar. Durch das Auftreten suprabasaler Progesteron-Werte kommt es zwar zur Inhibierung eines LH-Peaks, jedoch wird die LH-Puls-Frequenz nicht unterdrückt, sondern erhöht (STOCK und FORTUNE, 1993). Über die fortwährenden LH-Pulse und die erhöhte LH-Rezeptordichte an ZOF (CALDER et al., 2001) kann die Wachstumsphase der induzierten ZOF aufrechterhalten werden. Dies erfolgt trotz der schon einsetzenden Luteinisierungsvorgänge und des Absinkens der Östradiol-Synthese.

1.5. Zyklusverlängerung

Durch die Langzeitbeobachtungen der induzierten ZOF in der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verlängerung des Zyklus in Folge der ZOF-Bildung kam. Hierbei zeigten 4 von 5 Tieren mit Indomethacin-induzierten ZOF einen verlängerten Zyklus von insgesamt 25-39 Tagen. Nur eines der Tiere, welches mit Indomethacin behandelt wurde, zeigte eine physiologische Zykluslänge von 19 Tagen. Bei diesem Tier erfolgte jedoch an Tag 7 während einer ultrasonographischen Kontrolluntersuchung eine Ruptur des induzierten ZOF.

Die Entleerung eines ZOF durch eine manuelle Sprengung oder eine Aspiration gilt als bekannte Therapiemethode (CRUZ et al., 2004; LIEVAART et al., 2006; AMIRIDIS, 2009). Durch die Entleerung des funktionellen ZOF soll es zur Unterbrechung der anhaltenden, auf den physiologischen Zyklus einflussnehmenden Steroidgenese kommen, sodass sich im Folgenden ein neuer Zyklus etablieren kann (LIEVAART et al., 2006). Aufgrund des erhöhten Risikos von Verklebungen am Ovar wird die umstrittene Methode der manuellen Sprengung jedoch teilweise durch ein Aspirationsverfahren ersetzt (AMIRIDIS, 2009). LIEVAART et al. (2006) konnten zeigen, dass 82,1 % der Tiere, bei denen ein ZOF therapeutisch aspiriert wurde, durchschnittlich innerhalb der

nächsten $13,3 \pm 6$ Tage eine Brunst zeigten. Diese Ergebnisse waren in Einklang mit AMIRIDIS (2009), der ebenfalls ZOF therapeutisch aspirierte und bei 94,5 % der Tiere innerhalb von $15 \pm 6,4$ Tagen eine Brunst beobachtete. Die Ergebnisse beider Studien werden durch die vorliegende Arbeit ergänzt: Das Einzeltier, bei welchem es zur Ruptur des mit Indomethacin induzierten ZOF kam, wurde wie erwartet innerhalb der nächsten 13 Tage brünstig und ovulierte physiologisch. Die übrigen Tiere hingegen zeigten eine typische Zyklusverlängerung bei bestehendem ZOF, wie es ebenfalls durch das Auftreten natürlich vorkommender ZOF beschrieben wird (HAMILTON et al., 1995).

2. Etablierungsschritte des erarbeiteten Modells

2.1. Anpassung des Injektionszeitpunktes

Wie schon vorherige Studien zeigen konnten, stellt beim Rind die intrafollikuläre Injektion eines COX-Inhibitors eine Möglichkeit der Ovulationsblockade dar (DE SILVA und REEVES, 1985; PETERS et al., 2004; LI et al., 2006). Im Vergleich zu anderen Studien wurde jedoch der Zeitpunkt der intrafollikulären Injektion eines COX-Inhibitors in den eigenen Arbeiten nach hinten verschoben.

So führten LI et al. (2006) intrafollikuläre Injektionen mit Indomethacin zeitgleich zur Anwendung von GnRH durch. Auch PETERS et al. (2004), die den Wirkstoff NS-398 nutzten, führten intrafollikuläre Injektionen schon zwei Stunden nach einer GnRH-Anwendung durch. Der Zeitpunkt der Injektion in den vorliegenden Arbeiten lag 16 Stunden nach einer GnRH-Anwendung. Durch die später durchgeführte Injektion war zum einen ein präzises Abstimmen auf das Einsetzen der steigenden COX-Aktivität möglich (etwa 18 Stunden nach GnRH-Applikation (SIROIS et al., 2004)), zum anderen beträgt die Plasma-Halbwertszeit von Indomethacin beim Rind nur etwa 5,3 Stunden (CRISTOFOL et al., 1996). Eine frühe Injektion kann somit eine abgeschwächte Effektivität des Wirkstoffes im Follikel durch Diffusion und Abbau zur Folge haben. Dies würde wiederum höherer Stoffkonzentrationen nötig machen. Der spätere Injektionszeitpunkt hat den weiteren Vorteil, dass der präovulatorische Follikel für eine längere Zeitspanne unter physiologischen Bedingungen heranreifen kann.

2.2. COX-Inhibitoren und deren dosisabhängige Wirkung

In den eigenen Arbeiten wurden alle COX-Inhibitoren in festen Dosierungen unabhängig des Follikelvolumens injiziert. Die Induktion von ZOF war sowohl abhängig von der eingesetzten Substanz als auch von deren Dosierung.

Die eingesetzte Indomethacin-Konzentration wurde in Anlehnung an die Studie von LI

et al. (2006) gewählt. LI et al. (2006) arbeiteten mit einer finalen Konzentration von 200 µg/ml Indomethacin im Follikel. Aufgrund eigener vorangegangener Zellversuche wurde im hier genutzten Tier-Modell jedoch weniger als ein Drittel dieser Dosierung angewandt. Die Dosierung wurde durch eine schrittweise Reduktion der Indomethacin-Konzentration in der Injektionslösung weiter gesenkt, um die minimal nötige Dosis, die noch zur ZOF-Bildung führte, zu ermitteln. Diese Dosierung (0,2 ml 35 µM) führte zu einer letztlich 25fach geringeren Endkonzentration in der Follikelflüssigkeit im Vergleich zu der von LI et al. (2006) genutzten Konzentration. Eine mögliche Erklärung für die dennoch ausreichende Effektivität der niedrigsten Dosierung stellt die zuvor beschriebene Optimierung des Injektionszeitpunktes dar.

Trotz der Veränderung des Injektionszeitpunktes führte die Anwendung des spezifischen COX-2-Inhibitors NS-398 hingegen nicht zur Inhibierung der Ovulation und zur Induktion von ZOF. Dies steht im Gegensatz zu der Studie von PETERS et al. (2004), die mit dem Einsatz von NS-398 erfolgreich eine Ovulation blockierten. Einen Unterschied zwischen beiden Studien stellt die verwendete Endkonzentration von NS-398 im injizierten Follikel dar. Bei PETERS et al. (2004) wurde eine finale Konzentration von 10 µM NS-398 im Follikel erzielt, in den eigenen Arbeiten hingegen nur eine Endkonzentration von 3,5 µM NS-398 (berechnet auf der Grundlage einer intrafollikulären Injektion von 0,2 ml einer 60 µM NS-398 Lösung in einen durchschnittlich großen Follikel von 18 mm Durchmesser). Eine Steigerung der Dosis war aufgrund der begrenzten Löslichkeit des Stoffes bei gleichbleibendem Injektionsvolumen jedoch nicht möglich.

Ebenso wie der spezifische COX-2-Inhibitor NS-398, konnte der semiselektive COX-2-Hemmer Meloxicam in niedrigen Konzentrationen die Ovulation nicht inhibieren. Erst die Anwendung der höchsten Dosis (0,2 ml 1725 µM) führte zur Ovulationsblockade und zur Induktion von ZOF. Durch die Anwendung hoher Meloxicam-Konzentrationen kommt es neben einer Hemmung der COX-2 auch zu einer vermehrten Hemmung der COX-1 von bis zum 25 % (VANE und BOTTING, 1998). Ungeachtet des Verteilungsvolumens von Meloxicam beträgt die therapeutisch empfohlene Dosierung beim Rind 0,0005 mg/g Körpergewicht (LÖSCHER et al., 2002). Die in den eigenen Arbeiten eingesetzte Konzentration, welche die Ovulation erfolgreich verhinderte, ergibt eine finale Konzentration von etwa 0,035 mg/ml in der Follikelflüssigkeit (bei Annahme eines durchschnittlich 18 mm großen Follikels). Diese Konzentration entspricht somit einem 70fachen der empfohlenen therapeutischen Dosierung. Dies lässt darauf schließen,

dass es durch die angewendete Meloxicam-Konzentration sowohl zu einer Hemmung der COX-1 als auch der COX-2 kommt. Vergleicht man die angewendeten Konzentrationen der verschiedenen COX-Inhibitoren, wird deutlich, dass die unspezifischen COX-Inhibitoren (Indomethacin, Flunixin) mit ihrer Endkonzentration im Follikel näher an den empfohlenen therapeutischen Dosierungen liegen als der semiselektive COX-2-Inhibitor Meloxicam. Die Endkonzentration von Flunixin im Follikel entspricht mit 0,003 mg/ml ungefähr der therapeutisch empfohlenen Dosierung beim Rind (0,002 mg/g Körpergewicht) (LÖSCHER et al., 2002). Hinsichtlich des Einsatzes von Indomethacin kann nur ein theoretischer Vergleich zwischen empfohlener therapeutischer Dosierung und injizierter Konzentration gezogen werden, da bei Tieren die systemische Indomethacin-Anwendung schon ab Dosierungen von 0,001 mg/g Körpergewicht gravierende Nebenwirkungen auslöst (LÖSCHER et al., 2002), sodass dieses NSAID in der Veterinärmedizin selten als Therapeutikum genutzt wird. Es ist jedoch zu vermuten, dass neben der niedrigsten noch effektiven finalen Konzentration von 8 µg/ml im Follikel weitaus geringere Dosierungen wirksam sind. Da NS-398 überhaupt nicht therapeutisch eingesetzt wird, kann kein Vergleich zur therapeutisch angewendeten Konzentration gezogen werden.

Die unspezifischen COX-1- und -2-Hemmstoffe inhibieren die Ovulation bei einer lokalen Anwendung am Follikel somit schon bei Nutzung therapeutisch empfohlener Konzentrationen im Gegensatz zu den spezifischeren COX-2-Inhibitoren, bei denen Konzentrationen benötigt werden, die deutlich über den nach Lehrbuch empfohlenen therapeutischen Dosierung liegen.

Eine Erklärung für die benötigten hohen Konzentrationen des semiselektiven COX-Inhibitors Meloxicam liegt in seiner bereits erwähnten konzentrationsabhängigen Isoform-spezifischen COX-Inhibierung. Der semiselektive COX-2-Inhibitor Meloxicam entfaltet in hohen Dosen die Wirkung eines unspezifischen COX-1 und -2-Inhibitors ähnlich wie Flunixin und Indomethacin. Dies lässt die Vermutung zu, dass der entscheidende Schritt der Ovulationshemmung nicht alleine auf einer Hemmung der PGE₂-Synthese beruht. Auch die Wirkung der unspezifischen Inhibitoren auf die COX-1 kann nicht der ausschlaggebende Faktor sein, da die Expression der COX-1 während des Ovulationsprozesses bekannterweise nur auf basalem Niveau erfolgt (SIROIS et al., 2004). Die unspezifischen Wirkstoffe müssen demnach über einen zusätzlichen Wirkungsmechanismus verfügen, welcher den spezifischen COX-2-Inhibitoren wie NS-398 fehlt. Dieser zusätzliche Mechanismus scheint ausschlaggebend für eine

Ovulationsblockade und die Entstehung von ZOF zu sein.

3. Biochemische Auswirkungen der eingesetzten Cyclooxygenase-Inhibitoren im Follikel

3.1. Senkung der Prostaglandin-Synthese im präovulatorischen Follikel

Die Injektion der COX-Inhibitoren Indomethacin und NS-398 in den präovulatorischen Follikel führte im gleichen Ausmaß zur Senkung der intrafollikulären PGE₂-Konzentration. Die unbehandelten Kontrollfollikel zeigten hingegen während der präovulatorischen Phase einen Anstieg der PGE₂-Konzentration.

Die PGE₂-Konzentrationen in den präovulatorischen Kontrollfollikeln lagen 16 Stunden nach GnRH-Anwendung bei durchschnittlich 2,5 ng/ml. Sie stiegen 21 Stunden nach GnRH-Anwendung auf 5,5fach höhere Konzentrationen an (durchschnittlich 13,7 ng/ml). In den mit der niedrigsten Indomethacin-Konzentration (35 µM) injizierten Follikeln wurden hingegen nur basale PGE₂-Konzentrationen von 0,4 ng/ml nachgewiesen. Der hiermit gezeigte Anstieg der PGE₂-Konzentration in präovulatorischen Follikeln und die massive Reduktion der PGE₂-Konzentration durch die intrafollikuläre Anwendung der COX-Inhibitoren sind vergleichbar mit Ergebnissen anderer Studien. Die Arbeit von LI et al. (2006) zeigte ebenfalls einen deutlichen Anstieg der PGE₂-Konzentration in präovulatorischen Follikeln vom Zeitpunkt der GnRH-Anwendung mit Werten von 0,35 ng/ml auf über 180fach erhöhte Werte 24 Stunden später. In Follikelflüssigkeiten, die ebenfalls 24 Stunden nach GnRH-Anwendung gewonnen wurden, bei denen die Follikel jedoch zuvor mit Indomethacin (Endkonzentration von 200 µg/ml Follikelflüssigkeit) injiziert wurden, trat eine Reduktion der PGE₂-Konzentration auf 0,13 ng/ml auf (LI et al., 2006). PETERS et al. (2004) erzielten durch die Injektion des spezifischen COX-2-Inhibitors NS-398 in bovine präovulatorische Follikel ebenfalls eine Reduktion um das Fünffache der intrafollikulären PGE₂-Gehalte 24 Stunden nach GnRH-Anwendung im Vergleich zu unbehandelten Follikeln. Eine äquivalente Reduktion der PGE₂-Konzentration um mehr als das Achtfache auf 0,3 ng/ml wurde in den mit NS-398 injizierten Follikeln der eigenen Arbeiten gemessen.

Trotz der gleichwertigen inhibitorischen Wirkung des NS-398 auf die COX-Aktivität, gemessen an der Reduktion der intrafollikulären PGE₂-Gehalte, konnte die Ovulation in den eigenen Untersuchungen nicht unterdrückt werden.

Dass der Anstieg der PGE₂-Gehalte nicht der alleinige Faktor für die Auslösung der

Ovulation ist, beziehungsweise die Inhibierung der intrafollikulären Prostaglandin-Synthese nicht der alleinige Auslöser der ZOF-Induktion sein kann, zeigten auch LI et al. (2007). In ihrer Studie wurde der 3β -HSD-Inhibitor Trilostane in bovine präovulatorische Follikel injiziert, um die Synthese von Progesteron zu inhibieren. Durch diese Inhibition kam es ebenfalls zur signifikanten Senkung sowohl der PGE_2 - ($< 4 \text{ ng/ml}$) als auch der $\text{PGF}_{2\alpha}$ -Gehalte im präovulatorischen Follikel 24 Stunden nach GnRH-Anwendung. Die unbehandelten Kontrollfollikel zeigten hingegen physiologische PGE_2 -Werte von über 60 ng/ml zum gleichen Zeitpunkt. Trotz der Senkung sowohl der Progesteron- als auch der Prostaglandin-Gehalte erfolgte eine physiologische Ovulation. Die in einer vorherigen Studie von LI et al. (2006) mit Indomethacin-injizierten Follikel ovulierten hingegen nicht, obwohl die PGE_2 -Synthese in ähnlichem Ausmaß reduziert wurde. Die Senkung der PGE_2 -Konzentration im präovulatorischen Follikel kann somit nicht der einzige Auslöser für die Inhibierung der Ovulation und die Bildung von ZOF sein.

3.2. Modulation intrafollikulärer proteolytischer Enzyme durch COX-Inhibitoren? Die eigenen Arbeiten zeigten, dass intrafollikuläre Injektionen der COX-Inhibitoren Indomethacin und NS-398 zwar in identischem Ausmaß zur Senkung der PGE_2 -Konzentration im Follikel führten, NS-398 jedoch die Ovulation nicht inhibierte. Ähnliche Ergebnisse erzielten, wie zuvor beschrieben, auch LI et al. (2006 und 2007) durch den Einsatz des intrafollikulär angewandten 3β -HSD-Inhibitors Trilostane. Sowohl der intrafollikuläre Einsatz von Indomethacin als auch von Trilostane führte in gleichem Ausmaß zur Senkung der PGE_2 -Gehalte. Dennoch erfolgten Ovulationen der Follikel, welche mit Trilostane injiziert wurden.

Eine Erklärung hierfür wird in einer veränderten Aktivität der Matrix-Metalloproteasen (MMPs) und den Gewebshemmern der Metalloproteasen (TIMPs) vermutet. MMPs und deren Inhibitoren TIMPs gehören neben den Plasminogen-Aktivatoren zur Familie der proteolytischen Enzyme und sind von besonderer Bedeutung für die Kontrolle des Umbaus der Extrazellulärmatrix im präovulatorischen Follikel (FATA et al., 2000). Sie tragen maßgeblich zum Abbau des Kollagengewebes kurz vor der Follikelruptur bei (BAKKE et al., 2002; LI et al., 2006). Bisher ist jedoch nur wenig über die Auswirkungen der verschiedenen MMPs am bovinen Follikel bekannt. MUTLAG et al. (2015) zeigten, dass die MMP-1- und -2-Gehalte in den Ovarien infertiler Kühe mit ZOF niedriger waren als bei fertilen Kühen. Die erniedrigten MMP-Gehalte wurden begleitet von niedrigeren Stickstoffmonoxid- und LH-Konzentrationen im Blut (MUTLAG et al., 2015). Diese Ergebnisse sind äquivalent zu den Resultaten von PERALTA et al. (2017), welche eine

erhöhte MMP-2- und TIMP-1-Aktivität in bovinen präovulatorischen Follikeln im Vergleich zu ZOF nachwiesen. MMP-9 wurde hingegen bisher nur in ZOF detektiert und nicht in präovulatorischen Follikeln. Aufgrund der gezeigten Veränderungen wurde als ZOF auslösender Faktor eine Imbalance zwischen den MMPs und deren TIMPs vermutet (PERALTA et al., 2017). BAKKE et al. (2002) beobachteten hingegen keine Veränderung der MMP-2-mRNA-Expression in präovulatorischen Follikeln bis 48 Stunden nach GnRH-Anwendung. Es wurde jedoch ein Anstieg der mRNA-Expression von MMP-14 und TIMP-2 in einem Zeitrahmen von 6-24 Stunden nach GnRH-Applikation gemessen (BAKKE et al., 2002).

In der zuvor beschriebenen Studie von LI et al. (2007) wurde kein verändertes Muster der Aktivität der MMPs 13, 14 und 28, sowie der TIMPs 1-3 zwischen den mit Trilostane injizierten und den unbehandelten Follikeln gemessen (LI et al., 2007). Die TIMP-4-mRNA-Expression war allerdings in Trilostane-injizierten Follikeln reduziert. Veränderungen im TIMP-4-Proteingehalt in Trilostane-injizierten und unbehandelten Follikeln wurden hingegen nicht nachgewiesen. In der Studie von LI et al. (2006) wurden ebenfalls MMP- und TIMP-Gehalte in Indomethacin-injizierten Follikeln im Vergleich zu Kontrollfollikeln 24 Stunden nach GnRH-Anwendung gemessen. Es wurden keine Veränderungen bezüglich der MMP-Gehalte in den Follikeln nachgewiesen. Die Gehalte des TIMP-4-Proteins waren in den Indomethacin-injizierten Follikeln jedoch signifikant erhöht. Die Aktivität sowohl des Gewebe-Plasminogenaktivators (tPA) als auch von Plasmin war in Indomethacin-injizierten Follikeln signifikant reduziert (LI et al., 2006). Die Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass neben der Senkung der PGE₂-Gehalte im präovulatorischen Follikel auch Veränderungen der proteolytischen Enzyme (MMPs, TIMPs, Plasmin, tPA) nötig sind, um eine Ovulation zu inhibieren.

Zudem führen unterschiedlich spezifische COX-Inhibitoren zu spezifischen Veränderungen der Aktivitätsmuster unterschiedlicher MMPs. Zum Beispiel zeigten humanmedizinische Studien, dass spezifische COX-2-Inhibitoren, wie NS-398 und Celecoxib, im gleichen Maße zur Steigerung der MMP-1- und -13-Aktivität in Synovialzellen führen (YORIFUJI et al., 2016). Der unspezifische COX-1- und -2-Inhibitor Diclofenac, welcher, wie Indomethacin auch, zur Stoffgruppe der Essigsäurederivate gehört, führt hingegen zur Steigerung der MMP-9-Expression und der Freisetzung der aktiven Proteinform in humanen Monozyten und Makrophagen (KIM et al., 2016). Weitere Aktivatoren für die Freisetzung der MMPs in humanen Synovialzellen sind reaktive Sauerstoffspezies (ROS), wie das oxidierte Low-Density Lipoprotein (oxLDL) (DE MUNTER et al., 2016). RIZZO et al. (2009) wiesen unterschiedliche ROS-

Konzentrationen zwischen ZOF und präovulatorischen Follikeln nach. Auch WEITZEL et al. (2014) zeigten, dass oxLDL durch die Interaktion mit dem LOX-1-Rezeptor in bovinen Granulosazellen zu Veränderungen der Östradiol-Synthese führt. Ob ein Zusammenhang zwischen veränderten ROS-Konzentrationen und der Freisetzung von MMPs am bovinen Ovar besteht, ist bisher jedoch unklar.

3.3. Modulation der intrafollikulären Thromboxan-Synthese und der Lipoxxygenase durch COX-Inhibitoren?

Wie in den eigenen Arbeiten gezeigt wurde, weisen die unspezifischen COX-Inhibitoren im Gegensatz zu den spezifischeren COX-2-Inhibitoren eine höhere Effektivität zur Inhibierung der Ovulation mit nachfolgender ZOF-Bildung auf.

Einen ausschließlich durch unspezifische COX-Inhibitoren beeinflussten Prozess stellt die Thromboxan-Synthese dar. Die Bildung von Thromboxanen in den Blutplättchen ist ein COX-1-abhängiger Prozess (SMITH et al., 1998). Thromboxane gehören wie die Prostaglandine zur Familie der Eikosanoide. Thromboxan-A₂ wird durch die Thromboxan-Synthase aus dem durch die COX-Reaktion gebildeten PGH₂ synthetisiert (FREY und LÖSCHER, 2007). Die Bildung des Thromboxan-A₂ erfolgt in den Thrombozyten und führt zur Plättchenaggregation und einer Vasokonstriktion (MATTEO et al., 2006). Humanmedizinische Studien belegten, dass Indomethacin bei gesunden Probanden die Thromboxan-Synthese an der Niere um mehr als 80 % senkt, im Gegensatz zu dem Einsatz des spezifischen COX-2-Inhibitors Celecoxib, der keinen Einfluss auf die Thromboxan-Produktion ausübte (STICHTENOTH et al., 2005). Die Inhibierung der Thromboxan-Synthese stellt somit einen zusätzlichen Wirkmechanismus der unspezifischen COX-1- und -2-Inhibitoren dar, welcher den spezifischen COX-2-Inhibitoren fehlt. Ein Vorkommen von Thromboxanen und der mRNA-Expression ihrer Rezeptoren konnte zudem für die männlichen Geschlechtsorgane festgestellt werden. So wiesen MATTEO et al. (2006) eine basale mRNA-Expression von Thromboxan-Rezeptoren an den Hodenarterien adulter Schafböcke nach, welche zudem durch eine systemische Stimulation mit hCG abnahm. JANINNI et al. (1994) zeigten, dass es durch eine Stimulation mit FSH zu einem Anstieg der Thromboxan-A₂- und -B₂-Synthese in Sertolizellen von Ratten kam. Die Ergebnisse dieser Studien legen die Vermutung nahe, dass Thromboxane auch am bovinen Ovar eine Rolle spielen können. Ein genauer Zusammenhang ist bisher jedoch unklar und bedarf weiterer Untersuchungen.

Bisher ungeklärt ist zudem, inwieweit verschiedene COX-Inhibitoren einen Einfluss auf die Lipoxxygenase-Reaktion haben.

So wurde von ESPEY et al. (1994) vermutet, dass die Ovulationsrate mit der Formation der 15-Hydroxyeicosatetraensäure (15-HETE) enger korreliert ist als mit der Bildung von PGE₂. Diese Vermutung wird auf Beobachtungen an Ratten und Kaninchen zurückgeführt, bei denen Indomethacin in niedrigen Dosierungen die PGE₂-Synthese signifikant reduzierte, die Tiere aber dennoch ovulierten. Erst bei höheren Indomethacin-Dosen, die auch die Bildung der 15-HETE inhibierten, erfolgte keine Ovulation mehr (ESPEY, 1994). Inwieweit die Lipoxxygenase-Reaktion Einfluss auf die physiologischen Vorgänge am bovinen Ovar hat, bedarf weiterer Untersuchungen.

4. Fazit zum Einsatz von Cyclooxygenase-Inhibitoren zur Induktion zystischer Ovarfollikel

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die lokale Anwendung eines COX-Inhibitors am präovulatorischen Follikel eine minimalinvasive Möglichkeit zur Induktion von ZOF darstellt.

Basierend auf den diskutierten Ergebnissen der eigenen Arbeiten kann davon ausgegangen werden, dass die unspezifischen COX-1- und -2-Inhibitoren (wie Flunixin und Indomethacin) eine zusätzliche Wirkung auf die Aktivität spezieller für die Ovulation ausschlaggebender Faktoren wie, z. B. Thromboxane, 15-HETE sowie MMPs und TIMPs entfalten könnten. Das Zusammenspiel zwischen der Senkung der PGE₂-Gehalte und der Auslenkung spezifischer proteolytischer Enzyme führt letztlich zur Ovulationsblockade. Hochselektive COX-2-Inhibitoren wie NS-398 führen zwar zu einer äquivalenten Senkung der PGE₂-Gehalte im präovulatorischen Follikel, ihnen fehlt jedoch wahrscheinlich der oben beschriebene zusätzliche Wirkmechanismus, weswegen eine Ovulation nicht verhindert wird. Semiselektive COX-2-Inhibitoren hingegen können offensichtlich in sehr hohen Konzentrationen den unspezifischen COX-1- und -2-Inhibitoren äquivalente zusätzliche Wirkmechanismen entfalten und führen so ebenfalls zur Blockade der Ovulation. Ein Wirkmechanismus über die COX-1 wird hingegen aufgrund der basalen Expressionsmuster weitestgehend ausgeschlossen.

Allerdings kann über die Auswertung der hier beschriebenen klinisch angelegten Arbeiten keine abschließende Aussage darüber getroffen werden, warum spezifischere COX-2-Inhibitoren nicht in gleichem Ausmaß die Ovulation unterdrücken und zur ZOF-Bildung führen wie unspezifische COX-Inhibitoren. Zur Klärung des zugrundeliegenden Pathomechanismus bedarf es weiterer zellbiologischer, molekularbiologischer und biochemischer Untersuchungen von Geweben der induzierten ZOF. Dabei sollten sowohl

die Aktivitätsmuster der proteolytischen Enzyme, wie den MMPs, deren Inhibitoren den TIMPs, dem Plasmin, als auch mögliche Veränderungen der Thromboxan-Synthese und der Lipoxigenase-Reaktion analysiert werden.

5. Schlussfolgerung und Ausblick

Durch die eigenen Arbeiten wurde gezeigt, dass eine lokale intrafollikuläre Injektion eines unspezifischen COX-1- und -2-Inhibitors in einen präovulatorischen Follikel erfolgreich zur Inhibierung der Ovulation und zur Bildung von ZOF beim Rind führt. Semiselektive COX-2-Inhibitoren entfalten nur dann die gewünschte Wirkung auf den Ovulationsprozess, wenn sie in Dosen appliziert werden, die eine partielle COX-1-Hemmung entfalten. Hochspezifische COX-2-Inhibitoren haben sich in den vorgestellten Studien in Bezug auf die Induktion von ZOF als unwirksam erwiesen.

Die Besonderheit des lokal basierten Modells lag in der Induktion von ZOF trotz eines erhaltenen LH-Peaks. Dieser wird in den eigenen Arbeiten als einer der wichtigsten Wachstumsstimulatoren erachtet. Durch das LH-Signal und die erhaltene Östradiol-Synthese in den ersten Tagen der ZOF-Entstehung blieb eine Atresie der induzierten Strukturen aus und es entwickelten sich ZOF mit einer Größe von über 25 mm. In der weiteren Entwicklung der induzierten ZOF kam es zu einer sekundären Luteinisierung mit Ausprägung suprabasaler Progesteron-Werte. Über die Ausbildung suprabasaler Progesteron-Werte und deren Einfluss auf die LH-Sekretion blieb das Wachstum der induzierten ZOF bis Tag 11 erhalten. Die morphologische und endokrinologische Ausprägung der induzierten ZOF entsprach zu Beginn der Definition einer Follikel-Theka-Zyste. Mit Einsetzen der Luteinisierung erfolgte eine Umwandlung hin zur Follikel-Lutein-Zyste beziehungsweise zu einem luteinisierten ZOF. Auch die Verlängerung des Zyklus, wie sie bei natürlich vorkommenden ZOF beschrieben wird, wurde bei den artifiziellen ZOF beobachtet.

Bezüglich der Pathogenese der ZOF-Bildung wurde gezeigt, dass eine Reduktion der PGE₂-Synthese im Follikel durch ein NSAID nicht als einziger Faktor für eine Ovulationsinhibierung mit nachfolgender ZOF-Bildung angesehen werden kann. Es scheinen weitere Faktoren zusätzlich zur Hemmung der PGE₂-Synthese entscheidend für die Entstehung von ZOF zu sein. Hierbei kommen vor allem Veränderungen der proteolytischen Enzyme (MMPs, TIMPs, Plasmin), der Thromboxan-Synthese und der Lipoxigenase-Aktivität in Frage. Die hier diskutierte lokale Modulation des inflammatorischen Geschehens im präovulatorischen Follikel stellt neben dem allgemein angenommenen endokrinologischen Pathogeneseweg (Veränderung der hypothalamisch-

hypophysär-ovariellen Achse) einen weiteren möglichen Pathomechanismus der ZOF-Entstehung dar.

Das erarbeitete Modell soll die Möglichkeit bieten, definierte Proben für weiterführende Untersuchungen zu gewinnen. Für die Generierung dieser Proben hat sich der Einsatz des unspezifische COX-Inhibitor Indomethacin im Besonderen bewehrt, da dieser vor allem auch in sehr geringen Konzentrationen zur Induktion von ZOF führt.

Zur weiteren Aufklärung der zugrundeliegenden Pathologie der ZOF sollen Beprobung des ZOF-Materials zu unterschiedlichen Entwicklungszeitpunkten durchgeführt werden. Die erste Beprobung der induzierten ZOF sollte am ersten Tag nach Ausbleiben der Ovulation erfolgen. Durch den kurz zuvor erfolgten Umschwung eines physiologischen Zustandes (dem präovulatorischen Follikel) hin zu einem pathologischen Zustand (dem Ausbleiben der Ovulation) kann ein direkter Vergleich beider Strukturen im Hinblick auf die Pathogenese erfolgen. Weitergehend bietet sich eine vergleichende Untersuchung zu diesem Zeitpunkt mit einem *Corpus haemorrhagicum* an.

Eine weitere Beprobung sollte um den vierten Tag nach der ausgebliebenen Ovulation erfolgen, an dem es zum bisher ungeklärten Einsetzen einer beginnenden Luteinisierung kam. Hierbei kann als physiologisches Vergleichsmaterial wiederum ein gleichalter Gelbkörper dienen oder auch ein natürlich vorkommender ZOF.

Zur Beprobung der induzierten ZOF sollte der gesamte Eierstock entnommen werden, um eine intakte ZOF-Struktur zu erhalten. Die Proben sollten in sich anschließenden Untersuchungen sowohl auf endokrinologischer (Hormonkonzentrationen der ZOF-Flüssigkeit), molekularbiologischer (Transkriptomanalysen), biochemischer (Proteomanalysen), histologischer als auch auf zellbiologischer Ebene untersucht werden. Interessant für die Zukunft bleibt, ob sich auch bei Tierkohorten mit erhöhter ZOF-Inzidenz bestimmte Faktoren identifizieren lassen, welche die Modulation des inflammatorischen Geschehens im präovulatorischen Follikel bewirken können. Beispielweise könnten dies erhöhte ROS-Konzentrationen im Blut sein, die zur Freisetzung von MMPs am bovinen Ovar führen.

VI. ZUSAMMENFASSUNG

Zystische Ovarfollikel (ZOF) sind bei Milchkühen, vor allem im postpartalen Zeitraum eine bekannte Ursache für eine verminderte Fruchtbarkeit. Obwohl diese Erkrankung schon seit langer Zeit bekannt ist, sind die zugrundeliegenden Entstehungsmechanismen bis heute nicht vollständig geklärt. Die größte Einschränkung bei der Erforschung von ZOF ist die bei klinischen Fällen im Grunde nur retrospektiv mögliche Betrachtungsweise der ZOF-Entstehung. Dies behindert eine kontrollierte Erforschung der zugrundeliegenden Pathomechanismen. Aufgrund dessen wurden in der Vergangenheit verschiedene Modelle zur ZOF-Induktion entwickelt. Bisher sind vor allem ZOF-Modelle bekannt, die auf einer systemischen Manipulation des ovariellen Zyklus basieren. ZOF-Modelle, die auf eine lokale Manipulation des Follikels abzielen, mit einer Langzeitverfolgung der induzierten Strukturen, gibt es bisher wenige. Zudem sind die induzierten Strukturen bisher nicht tiefergehend analysiert und charakterisiert worden.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein Modell zur ZOF-Induktion bei Rindern zu etablieren, welches auf der Nutzung einer intrafollikulären Injektion eines Cyclooxygenase (COX)-Hemmers basiert. Beruhend auf der Annahme, dass die Hochregulierung der COX-Enzymaktivität und der damit verbundene Anstieg von Prostaglandinen (vor allem PGE_2) im präovulatorischen Follikel den Schlüsselmediator für die Ovulation darstellt, wurde zunächst der COX-1- und -2-Inhibitor Indomethacin gewählt, um eine physiologische Ovulation zu unterdrücken und eine ZOF-Entwicklung zu induzieren.

Hierfür wurde bei insgesamt 18 Holstein-Friesians durch die Anwendung von $\text{PGF}_{2\alpha}$, gefolgt von GnRH 54 Stunden später eine Brunst induziert, um einen präovulatorischen Follikel (nach LH-Peak) zu erzeugen. Ultraschallgeleitete transvaginale intrafollikuläre Injektionen wurden an 23 präovulatorischen Follikeln mit verschiedenen Indomethacin-Konzentrationen (279 μM , 140 μM , 70 μM , 35 μM , 5 μM) durchgeführt. Die Injektionen erfolgten mit einem Volumen von 0,2 ml 16 Stunden nach der GnRH-Applikation. Für die Kontrollgruppe wurden Injektionen mit 0,2 ml einer 0,5 %igen Ethanol-Lösung durchgeführt. Nach der Injektion wurden die Tiere zweimal wöchentlich untersucht, um eine mögliche Ovulation oder die Bildung eines ZOF nachzuverfolgen. Zusätzlich wurden den Tieren Blutproben für weitere Hormonanalysen entnommen. Injektionen mit Indomethacin in einer Konzentration von oder über 35 μM führten zum Ausbleiben der Ovulation und zur ZOF-Bildung. Tiere, die mit 0,2 ml einer 0,5 %igen Ethanol- oder

5 μM Indomethacin-Lösung behandelt wurden, zeigten eine physiologische Ovulation mit nachfolgender Gelbkörperbildung. Die induzierten ZOF wuchsen bis zum 4. Tag nach der Injektion auf $30,8 \pm 2,8$ mm heran und erreichten weitere sieben Tage später einen maximalen Durchmesser von $36,9 \pm 4,5$ mm. Die ersten Anzeichen einer Luteinisierung, definiert über eine geringe Zunahme der Wanddicke und einer erhöhten Durchblutung des ZOF, wurden ab Tag 4 nach der Injektion beobachtet. Die Plasma-Progesteron-Konzentration stieg ebenfalls ab Tag 4 nach der Injektion leicht an und erreichte an Tag 7 Werte von $0,9 \pm 0,19$ ng/ml. Östradiol hingegen erreichte mit $15,8 \pm 2,1$ ng/ml die höchste Plasmakonzentration an Tag 4 mit nachfolgendem Rückgang. Der Zyklus der Tiere, die einen ZOF entwickelten, verlängerte sich insgesamt auf 25-39 Tage.

Zudem wurde das Absinken der PGE_2 -Konzentration in der Follikelflüssigkeit von injizierten und unbehandelten Follikeln bestimmt, um die biologische Aktivität der minimal nötigen Indomethacin-Dosis nachzuweisen, welche noch zu einer ZOF-Entstehung führt. Hierfür wurden sowohl Follikel 5 Stunden nach der Injektion mit 0,2 ml einer 35 μM Indomethacin-Lösung transvaginal unter Ultraschallkontrolle aspiriert ($n = 3$) als auch unbehandelte präovulatorische Follikel, 16 ($n = 3$) und 21 Stunden ($n = 5$) nach GnRH-Anwendung.

Die mittlere PGE_2 -Konzentration der unbehandelten, präovulatorischen Follikel 16 Stunden nach GnRH-Anwendung, lag bei $2,5 \pm 0,5$ ng/ml und stieg 21 Stunden nach GnRH-Anwendung auf $13,7 \pm 6,8$ ng/ml in der Follikelflüssigkeit an. Im Vergleich hierzu waren die PGE_2 -Werte der mit Indomethacin-injizierten Follikel auf $0,4 \pm 0,1$ ng/ml reduziert.

Zur Evaluierung der Reproduzierbarkeit des erarbeiteten Modells wurde ein weiterer unspezifischer COX-1 und -2-Inhibitor einer anderen Stoffgruppe eingesetzt. Hierfür wurde Flunixin-Meglumin in zwei verschiedenen Konzentrationen (56 μM und 338 μM) angewandt. Da der Anstieg der COX-2 ausschlaggebend für die Ovulation ist, wurde zudem die Wirksamkeit spezifischer COX-2-Inhibitoren untersucht. Hierfür wurden der semiselektive COX-2-Hemmstoff Meloxicam in drei verschiedenen Konzentrationen (57 μM , 172 μM , 1725 μM) und der hochspezifische COX-2-Hemmstoff NS-398 (60 μM) eingesetzt. Als Kontrolle wurden Injektionen einer 0,4 %igen DMSO-Lösung und einer 0,9 %igen NaCl-Lösung durchgeführt. Zusätzlich wurden NS-398-injizierte Follikel 5 Stunden nach der Injektion aspiriert, um PGE_2 -Konzentrationen zu messen.

Flunixin-Meglumin inhibierte die Ovulation in einer Konzentration von 338 μM und führte zur Bildung von ZOF. Der spezifische Inhibitor Meloxicam blockierte die Ovulation erst in sehr hohen Konzentrationen (1725 μM). Weder die niedrigen

Konzentrationen von Meloxicam noch die NS-398-Lösung oder die Anwendung der Kontrolllösungen führten zur Inhibierung der Ovulation. Dennoch erzeugte NS-398 eine deutliche Reduktion der PGE₂-Gehalte, in einem vergleichbarem Ausmaß wie es in Indomethacin-injizierten Follikeln beobachtet wurde ($0,3 \pm 0,2$ ng/ml vs. $0,4 \pm 0,1$ ng/ml in der Follikelflüssigkeit). Sowohl mit Flunixin-Meglumin als auch mit Meloxicam erzeugte ZOF zeigten ähnliche Wachstumsraten wie die mit Indomethacin induzierten ZOF ($30,4 \pm 1,7$, $28,3 \pm 4$, $30,8 \pm 2,8$ mm, jeweils an Tag 4 nach der Injektion). Ebenfalls wurden ab Tag 4 erste Anzeichen einer beginnenden Luteinisierung beobachtet.

Zusammenfassend induziert das vorgestellte Modell durch eine minimalinvasive, lokal wirkende Methode ZOF bei Rindern und dies nach einer physiologischen Follikelentwicklung und LH-Ausschüttung. Die induzierten ZOF weisen bezüglich ihrer Größe, Morphologie, Persistenz und ihrer Störung des ovariellen Zyklus hohe Ähnlichkeiten zu natürlich vorkommenden ZOF auf. Darüber hinaus lassen die Untersuchungen vermuten, dass die ZOF-induzierende Wirkung der COX-Hemmer nicht alleine auf die Inhibition der PGE₂-Synthese zurückzuführen ist. Die induzierten ZOF bieten die Möglichkeit, definierte Proben für weitere Untersuchungen zu gewinnen, um die zugrundeliegenden molekularen und endokrinologischen Mechanismen der ZOF-Entstehung weiter zu beleuchten.

VII. SUMMARY

Cystic ovarian follicles (COFs) are a known disease leading to subfertility in dairy lactating cows, especially during the post partum period. Although the disease is known for a long time the underlying pathomechanisms are still unclear. The biggest difficulty in the research of COFs is that COF formation can only be investigated retrospectively. This is in contrast to research of the underlying pathomechanisms. Due to this fact several models were established to induce COFs in cattle. Most of them are based on a systemic manipulation of the ovarian cycle. Models, which are based on a local manipulation of the follicle and a long-term examination of the induced structures, are rare.

The aim of the present investigation was to establish a model to induce COFs in cattle by using an intrafollicular injection of a cyclooxygenase (COX) inhibitor. Based on the assumption that the upregulation of COX activity and the resulting increase of prostaglandins in the preovulatory follicle (especially PGE₂) is the key step for the ovulation, the unspecific COX-1 and -2 inhibitor indomethacin was chosen to interrupt the physiological ovulation and to induce further the development of COFs.

Therefore, heat was induced in 18 Holstein-Frisian cattle, with PGF_{2α} followed by a GnRH administration 54 h later to produce post-LH-surge preovulatory follicles. Ultrasound-guided transvaginal intrafollicular injections were performed in 23 preovulatory follicles with different concentrations of indomethacin (279 μM, 140 μM, 70 μM, 35 μM, 5 μM). Injections were done with a volume of 0.2 ml 16 h after the GnRH administration. The control group received an injection with 0.2 ml of a 0.5 % ethanol solution. Following the injection procedure, cattle were examined by ultrasound two times a week to monitor ovulation or the development of a COF. Additional blood samples were taken for hormone analysis.

Injections of indomethacin solution with concentrations 35 μM or higher inhibited the ovulation and led to COF formation. Cattle treated with 0.2 ml of a 0.5 % ethanol or 5 μM indomethacin solution showed a physiological ovulation and *Corpus luteum* formation. The induced COFs grew to a size of 30.8 ± 2.8 mm on day four after injection and reached a maximum mean diameter of 36.9 ± 4.5 mm another seven days later. A beginning luteinization, defined by a slight thickening of the follicular wall and the increase of vascularization, was seen 4 days after injection. Plasma progesterone increased slowly after day 4 and reached a concentration of 0.9 ± 0.19 ng/ml on day 7 after injection. In contrast, plasma estradiol peaked on day 4 after injection with a concentration of

15.8 ± 2.1 ng/ml and decreased thereafter. The estrous cycle of cattle with COF formation was extended to a total of 25-39 days.

Furthermore, to prove the bioactivity of the lowest indomethacin solution, leading to COF formation, the decrease of PGE₂ concentration in the follicular fluid was determined in injected and untreated follicles. Therefore, follicles injected with 0.2 ml 35 µM indomethacin solution (n = 3) were ultrasound-guided transvaginally aspirated 5 h after the injection procedure (= 21 h after GnRH administration), as well as untreated, preovulatory follicles 16 h (n = 3) and 21 h (n = 5) after GnRH administration, respectively.

The mean PGE₂ concentration of untreated preovulatory follicles, aspirated 16 h after GnRH administration, was 2.5 ± 0.5 ng/ml and increased to 13.7 ± 6.8 ng/ml in follicles aspirated 21 h after GnRH administration. In contrast, the PGE₂ concentration of indomethacin injected follicles remained at 0.4 ± 0.1 ng/ml.

For the evaluation of the reproducibility of the established model, the use of another unspecific COX-1 and -2 inhibitor but from a different substance group was tested. Therefore, the unspecific COX inhibitor flunixin-meglumin was used in two different concentrations (56 µM, 338 µM, respectively). As the upregulation of the COX-2 in the preovulatory follicle is mainly the key step for ovulation, the effectiveness of specific COX-2 inhibitors was evaluated additionally. Therefore, the semi-selective COX-2 inhibitor meloxicam in three different concentrations (57 µM, 172 µM, 1725 µM) and the highly specific COX-2 inhibitor NS-398 (60 µM) were chosen. As vehicle controls a 0.4 % DMSO solution and a 0.9 % NaCl solution were injected. Additional, follicles treated with 60 µM NS-398 were aspirated 5 h after injection to measure PGE₂ concentrations.

Flunixin-meglumine inhibited the ovulation with a concentration of 338 µM and formed COFs further. The specific inhibitor meloxicam blocked the ovulation only in a high concentration of 1725 µM, while lower concentrations of meloxicam, NS-398 and controls failed. Indeed, NS-398 showed comparable bioactivity as indicated by a decrease of PGE₂ comparable to indomethacin injected follicles (0.3 ± 0.2 ng/ml vs. 0.4 ± 0.1 ng/ml). The COFs induced by flunixin-meglumine or meloxicam showed similar growth rates, compared to COFs induced by indomethacin (30.4 ± 1.7 mm, 28.3 ± 4 mm, 30.8 ± 2.8 mm, respectively, 4 days after injection). First signs of a beginning luteinization were seen 4 days after injection, too.

In conclusion the presented method uses a minimal invasive local acting procedure to induce COFs in cattle, even after physiological follicle development and LH-surge. The

induced COFs meet clinical criteria of naturally occurring COFs regarding size, morphology, persistence and interference with the cyclicity. Furthermore, the results suggest that COX inhibitors might not only act via the cyclooxygenase pathway in to induce COFs. Defined samples of induced COFs will provide the opportunity for further investigations to elucidate underlying molecular and endocrine mechanisms leading to cystic ovarian disorders.

VIII. LITERATURVERZEICHNIS

Acosta TJ, Berisha B, Ozawa T, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Evidence for a local endothelin-angiotensin-atrial natriuretic peptide system in bovine mature follicles in vitro: Effects on steroid hormones and prostaglandin secretion. *Biology of Reproduction* 1999; 61: 1419-25.

Acosta TJ, Ozawa T, Kobayashi S, Hayashi K, Ohtani M, Kraetzel WD, Sato K, Schams D, Miyamoto A. Periovarian changes in the local release of vasoactive peptides, prostaglandin F-2 alpha, and steroid hormones from bovine mature follicles in vivo. *Biology of Reproduction* 2000; 63: 1253-61.

Acosta TJ, Yoshizawa N, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the early and midcycle corpus luteum after prostaglandin F-2 alpha injection in the cow. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 651-8.

Acosta TJ, Hayashi KG, Ohtani M, Miyamoto A. Local changes in blood flow within the preovulatory follicle wall and early corpus luteum in cows. *Reproduction* 2003; 125: 759-67.

Akil M, Amos RS, Stewart P. Infertility may sometimes be associated with NSAID consumption. *British Journal of Rheumatology* 1996; 35: 76-8.

Alfaro NS, Salvetti NR, Velazquez MM, Stangaferro ML, Rey F, Ortega HH. Steroid receptor mRNA expression in the ovarian follicles of cows with cystic ovarian disease. *Research in Veterinary Science* 2012; 92: 478-85.

Alila HW, Corradino RA, Hansel W. A comparison of the effects of cyclooxygenase prostanoids on progesterone production by small and large bovine luteal cells. *Prostaglandins* 1988; 36: 259-70.

Amiridis GS. Comparison of aspiration and hormonal therapy for the treatment of ovarian cysts in cows. *Acta Veterinaria Hungarica* 2009; 57: 521-9.

Anderson LE, Wu YL, Tsai SJ, Wiltbank MC. Prostaglandin F-2 alpha receptor in the corpus luteum: recent information on the gene, messenger ribonucleic acid, and protein. *Biology of Reproduction* 2001; 64: 1041-7.

Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA. Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: A basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 2004; 145: 2551-60.

Bakke LJ, Dow M, Cassar CA, Peters MW, Pursley JR, Smith GW. Effect of the preovulatory gonadotropin surge on matrix metalloproteinase (MMP)-14, MMP-2, and

tissue inhibitor of metalloproteinases-2 expression within bovine periovulatory follicular and luteal tissue. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 1627-34.

Balogh OG, Tury E, Abonyi-Toth Z, Kastelic J, Gabor G. Macroscopic and histological characteristics of fluid-filled ovarian structures in dairy cows. *Acta Veterinaria Hungarica* 2014; 62: 215-32.

Baufeld A, Vanselow J. Increasing cell plating density mimics an early post-LH stage in cultured bovine granulosa cells. *Cell and Tissue Research* 2013; 354: 869-80.

Berger G. Incidence and therapy of ovarian cysts in cattle - results from breeding hygiene attention to large dairy-cattle herd. *Monatshefte Für Veterinärmedizin* 1985; 40: 433-6.

Berisha B, Schams D. Ovarian function in ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* 2005; 29: 305-17.

Berisha B, Schams D, Rodler D, Sinowatz F, Pfaffl MW. Expression and localization of members of the thrombospondin family during final follicle maturation and corpus luteum formation and function in the bovine ovary. *Journal of Reproduction and Development* 2016; 62: 501-10.

Berisha B, Rodler D, Schams D, Sinowatz F, Pfaffl MW. Prostaglandins in Superovulation Induced Bovine Follicles During the Preovulatory Period and Early Corpus Luteum. *Frontiers in Endocrinology* 2019; 10: Article 467.

Besman MJ, Yanagibashi K, Lee TD, Kawamura M, Hall PF, Shively JE. Identification of des-(Gly-Ile)-endozepine as an effector of corticotropin-dependent adrenal steroidogenesis: stimulation of cholesterol delivery is mediated by the peripheral benzodiazepine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1989; 86: 4897-901.

Borsberry S, Dobson H. Periparturient diseases and their effect on reproductive-performance in 5 dairy herds. *Veterinary Record* 1989; 124: 217-9.

Boryczko Z, Bostedt H, Hoffmann B. Comparison of the hormonal and chemical-composition of the fluid from bovine ovarian follicles and cysts. *Reproduction in Domestic Animals* 1995; 30: 36-8.

Bowolaksono A, Nishimura R, Hojo T, Sakumoto R, Acosta TJ, Okuda K. Anti-apoptotic roles of prostaglandin E2 and E2 alpha in bovine luteal steroidogenic cells. *Biology of Reproduction* 2008; 79: 310-7.

Braw-Tal R, Pen S, Roth Z. Ovarian cysts in high-yielding dairy cows. *Theriogenology* 2009; 72: 690-8.

Bridges PJ, Komar CM, Fortune JE. Gonadotropin-induced expression of messenger ribonucleic acid for cyclooxygenase-2 and production of prostaglandins E and F-2 alpha in bovine preovulatory follicles are regulated by the progesterone receptor. *Endocrinology* 2006; 147: 4713-22.

Bridges PJ, Fortune JE. Regulation, action and transport of prostaglandins during the periovulatory period in cattle. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2007; 263: 1-9.

Calder MD, Manikkam M, Salfen BE, Youngquist RS, Lubahn DB, Lamberson WR, Garverick HA. Dominant bovine ovarian follicular cysts express increased levels of messenger RNAs for luteinizing hormone receptor and 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase Delta(4),Delta(5) isomerase compared to normal dominant follicles. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 471-6.

Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002; 99: 13926-31.

Cook DL, Smith CA, Parfet JR, Youngquist RS, Brown EM, Garverick HA. Fate and turnover rate of ovarian follicular cysts in dairy-cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990; 90: 37-46.

Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Moss GE, Youngquist RS, Garverick HA. Secretory patterns of lh and fsh during development and hypothalamic and hypophyseal characteristics following development of steroid-induced ovarian follicular cysts in dairy-cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 1991; 91: 19-28.

Cristofol C, Valladares JE, Franquelo C, Marti G, Arboix M. Pharmacokinetics of indomethacin in cattle. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 1996; 19: 72-4.

Cruz CE, Corbellini LG, Driemeier D. Simple procedure for emptying long-term ovarian cysts in cattle. *Veterinary Record* 2004; 155: 599-601.

Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R. Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E-2 and interleukin-1 beta. *Endocrinology* 1999; 140: 2685-95.

de Munter W, van der Kraan PM, van den Berg WB, van Lent P. High systemic levels of low-density lipoprotein cholesterol: fuel to the flames in inflammatory osteoarthritis? *Rheumatology* 2016; 55: 16-24.

De Silva M, Reeves JJ. Indomethacin inhibition of ovulation in the cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 1985; 75: 547-9.

Diaz FJ, Anderson LE, Wu YL, Rabot A, Tsai SJ, Wiltbank MC. Regulation of progesterone and prostaglandin F-2 alpha production in the CL. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; 191: 65-80.

Diaz PU, Stangaferro ML, Gareis NC, Silvia WJ, Matiller V, Salvetti NR, Rey F, Barberis F, Cattaneo L, Ortega HH. Characterization of persistent follicles induced by prolonged treatment with progesterone in dairy cows: An experimental model for the study of ovarian follicular cysts. *Theriogenology* 2015; 84: 1149-60.

Dobson H, Ribadu AY, Noble KM, Tebble JE, Ward WR. Ultrasonography and hormone profiles of adrenocorticotrophic hormone (ACTH)-induced persistent ovarian follicles (cysts) in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 120: 405-10.

Einspanier R, Schuster H, Schams D. A comparison of hormone levels in follicle-lutein-cysts and in normal bovine ovarian follicles. *Theriogenology* 1993; 40: 181-8.

Engelhardt Wv, Breves G, Aurich C (2010) *Physiologie der Haustiere*, 3., vollst. überarb. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, Kap. 22.1 Reproduktion bei weiblichen Haussäugetieren, S. 535-52.

Erb RE, Surve AH, Callahan CJ, Randel RD, Garverick HA. Reproductive steroids in the bovine. VII. Changes postpartum. *Journal of Animal Sciences* 1971; 33: 1060-71.

Espey LL. Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction* 1994; 50: 233-8.

Fata JE, Ho ATV, Leco KJ, Moorehead RA, Khokha R. Cellular turnover and extracellular matrix remodeling in female reproductive tissues: functions of metalloproteinases and their inhibitors. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2000; 57: 77-95.

Ferreira R, Oliveira JF, Fernandes R, Moraes JF, Goncalves PB. The role of angiotensin II in the early stages of bovine ovulation. *Reproduction* 2007; 134: 713-9.

Fields MJ, Fields PA. Morphological characteristics of the bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Theriogenology* 1996; 45: 1295-325.

Fortune JE, Willis EL, Bridges PJ, Yang CS. The periovulatory period in cattle: progesterone, prostaglandins, oxytocin and ADAMTS proteases. *Animal Reproduction* 2009; 6: 60-71.

Frey H-H, Löscher W (2007) *Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie für die Veterinärmedizin* : 131 Tabellen, Sonderausg. der 2. Aufl., Enke Verlag, Stuttgart, Kap. 12 Pharmakologie der Entzündung und der Allergie, S. 318-44.

Garverick HA. Ovarian follicular cysts in dairy cows. *Journal of Dairy Sciences* 1997; 80: 995-1004.

Grunert E, Berchtold M (1999) *Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind : mit 446 Abb., davon 130 auf Farbtaf., und 49 Tabellen, 3., Neubearb. Aufl., Parey Verlag, Berlin, Kap. 1 Physiologie der Fortpflanzung S.4-5, Kap. 4 Ovarielle Dysfunktionen S. 119-132.*

Gümen A, Wiltbank MC. An alteration in the hypothalamic action of estradiol due to lack of progesterone exposure can cause follicular cysts in cattle. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 1689-95.

Gümen A, Sartori R, Costa FMJ, Wiltbank MC. A GnRH/LH surge without subsequent progesterone exposure can induce development of follicular cysts. *Journal of Dairy Science* 2002; 85: 43-50.

Gümen A, Wiltbank MC. Follicular cysts occur after a normal estradiol-induced GnRH/LH surge if the corpus hemorrhagicum is removed. *Reproduction* 2005; 129: 737-45.

Hamilton SA, Garverick HA, Keisler DH, Xu ZZ, Loos K, Youngquist RS, Salfen BE. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy-cows. *Biology of Reproduction* 1995; 53: 890-8.

Hampton JH, Salfen BE, Bader JF, Keisler DH, Garverick HA. Ovarian follicular responses to high doses of pulsatile luteinizing hormone in lactating dairy cattle. *Journal of Dairy Science* 2003; 86: 1963-9.

Hatler TB, Hayes SH, da Fonseca LFL, Silvia WJ. Relationship between endogenous progesterone and follicular dynamics in lactating dairy cows with ovarian follicular cysts. *Biology of Reproduction* 2003; 69: 218-23.

Hawkey CJ. COX-1 and COX-2 inhibitors. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2001; 15: 801-20.

Hayashi K, Acosta TJ, Berisha B, Kobayashi S, Ohtani M, Schams D, Miyamoto A. Changes in prostaglandin secretion by the regressing bovine corpus luteum. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2003; 70: 339-49.

Herzog K, Brockhan-Ludemann M, Kaske M, Beindorff N, Paul V, Niemann H, Bollwein H. Luteal blood flow is a more appropriate indicator for luteal function during the bovine estrous cycle than luteal size. *Theriogenology* 2010; 73: 691-7.

Horn F, Moc I, Schneider N, Grillhösl C, Berghold S, Lindenmeier G (2005) *Biochemie des Menschen: Das Lehrbuch für das Medizinstudium; 3., grundlegend überarb. und erw.*

Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, Kap. 24.1 Eikosanoide S.414-8.

Isobe N, Yoshimura Y. Localization of apoptotic cells in the cystic ovarian follicles of cows: A DNA-end labeling histochemical study. *Theriogenology* 2000; 53: 897-904.

Isobe N, Kitabayashi M, Yoshimura Y. Microvascular distribution and vascular endothelial growth factor expression in bovine cystic follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 2005; 29: 634-45.

Isobe N. Follicular cysts in dairy cows. *Animal Science Journal* 2007; 78: 1-6.

Jannini EA, Ulisse S, Cecconi S, Cironi L, Colonna R, Darmiento M, Santoni A, Cifone MG. Follicle-stimulating hormone-induced phospholipase-a(2) activity and eicosanoid generation in rat sertoli cells. *Biology of Reproduction* 1994; 51: 140-5.

Jeengar K, Chaudhary V, Kumar A, Raiya S, Gaur M, Purohit GN. Ovarian cysts in dairy cows: old and new concepts for definition, diagnosis and therapy. *Animal Reproduction* 2014; 11: 63-73.

Jesam C, Salvatierra AM, Schwartz JL, Fuentes A, Croxatto HB. Effect of oral administration of a continuous 18 day regimen of meloxicam on ovulation: experience of a randomized controlled trial. *Contraception* 2014; 90: 168-73.

Juengel JL, Garverick HA, Johnson AL, Youngquist RS, Smith MF. Apoptosis during luteal regression in cattle. *Endocrinology* 1993; 132: 249-54.

Kaneko H, Todoroki J, Noguchi J, Kikuchi K, Mizoshita K, Kubota C, Yamakuchi H. Perturbation of estradiol-feedback control of luteinizing hormone secretion by immunoneutralization induces development of follicular cysts in cattle. *Biology of Reproduction* 2002; 67: 1840-5.

Kawate N, Inaba T, Mori J. A quantitative comparison in the bovine of steroids and gonadotropin receptors in normally developing follicles and in follicular and luteinized cysts. *Animal Reproduction Science* 1990; 23: 273-81.

Kesler DJ, Garverick HA, Bierschwal CJ, Elmore RG, Youngquist RS. Reproductive hormones associated with normal and abnormal changes in ovarian follicles in postpartum dairy-cows. *Journal of Dairy Science* 1979; 62: 1290-6.

Kesler DJ, Garverick HA. Ovarian cysts in dairy cattle: a review. *Journal of Animal Science* 1982; 55: 1147-59.

Kim BY, Son Y, Eo SK, Park YC, Kim K. Diclofenac inhibits 27-hydroxycholesterol-induced inflammation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2016; 478: 1456-61.

Kidder, HE. Studies on fertilization failure and embryonic death. Effects of the male and preovulatory environment of ova. Ph. D. Thesis, University of Wisconsin 1954.

Kim KD, Ki KS, Kang HG, Kim IH. Risk factors and the economic impact of ovarian cysts on reproductive performance of dairy cows in Korea. *Journal of Reproduction and Development* 2005; 51: 491-8.

Kim SO, Duffy DM. Mapping PTGERs to the Ovulatory Follicle: Regional Responses to the Ovulatory PGE2 Signal. *Biology of Reproduction* 2016; 95: 1-11.

Kis B, Snipes JA, Isse T, Nagy T, Busija DW. Putative cyclooxygenase-3 expression in rat brain cells. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 2003; 23: 1287-92.

Kotwica J, Skarzynski D, Mlynarczuk J, Rekawiecki R. Role of prostaglandin E-2 in basal and noradrenaline-induced progesterone secretion by the bovine corpus luteum. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2003; 70: 351-9.

Langenbach R, Morham SG, Tianio HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O. Prostaglandin-synthase-1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric-ulceration. *Cell* 1995; 83: 483-92.

Lapp R, Röttgen V, Viergutz T, Weitzel JM, Vernunft A. Induction of cystic ovarian follicles (COFs) in cattle by using an intrafollicular injection of indomethacin. *Journal of Reproduction and Development* 2020; 66: 181-8.

Lee CN, Cook DL, Parfet JR, Smith CA, Youngquist RS, Garverick HA. Induction of persistent ovarian follicular structures following administration of progesterone near the onset of estrus in dairy-cattle. *Journal of Dairy Science* 1988; 71: 3505-8.

Leidl W, Stolla R, Hundschell C, Bostedt H. Cystic ovarian disease in cattle .1. classification and diagnosis. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 1979; 92: 369-76.

Li Q, Jimenez-Krassel F, Kobayashi Y, Ireland JJ, Smith GW. Effect of intrafollicular indomethacin injection on gonadotropin surge-induced expression of select extracellular matrix degrading enzymes and their inhibitors in bovine preovulatory follicles. *Reproduction* 2006; 131: 533-43.

Li QL, Jimenez-Krassel F, Bettgowdal A, Ireland JJ, Smith GW. Evidence that the preovulatory rise in intrafollicular progesterone may not be required for ovulation in cattle. *Journal of Endocrinology* 2007; 192: 473-83.

Li QL, Jimenez-Krassel F, Ireland JJ, Smith GW. Gene expression profiling of bovine preovulatory follicles: gonadotropin surge and prostanoid-dependent up-regulation of genes potentially linked to the ovulatory process. *Reproduction* 2009; 137: 297-307.

Lievaart JJ, Parlevliet JM, Dieleman SJ, Rientjes S, Bosman E, Vos PL. Transvaginal aspiration as first treatment of ovarian follicular cysts in dairy cattle under field circumstances. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 2006; 131: 438-42.

Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK. Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 1997; 91: 197-208.

Liptrap RM, McNally PJ. Steroid concentrations in cows with corticotropin-induced cystic ovarian follicles and the effect of prostaglandin F₂α and indomethacin given by intrauterine injection. *American Journal of Veterinary Research* 1976; 37: 369-75.

Liu JM, Sirois J. Follicle size-dependent induction of prostaglandin G/H synthase-2 during superovulation in cattle. *Biology of Reproduction* 1998; 58: 1527-32.

Liu JM, Antaya M, Boerboom D, Lussier JG, Silversides DW, Sirois J. The delayed activation of the prostaglandin G/H synthase-2 promoter in bovine granulosa cells is associated with down-regulation of truncated upstream stimulatory factor-2. *Journal of Biological Chemistry* 1999; 274: 35037-45.

Löffler G, Petrides PE (2014) Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie, 7., völlig Neubearb. Aufl., Springer Verlag, Berlin, Kap. 14 Stoffwechsel von Triacylglyceriden und Fettsäuren, S.451-5.

Lopez-Gatius F, Santolaria P, Yaniz J, Fenech M, Lopez-Bejar M. Risk factors for postpartum ovarian cysts and their spontaneous recovery or persistence in lactating dairy cows. *Theriogenology* 2002; 58: 1623-32.

Löscher W, Ungemach FR, Kroker R (2003) Pharmakotherapie bei Haus- und Nutztieren: 6., aktualisierte Aufl., Parey Verlag, Berlin, Kap. Pharmaka zur Beeinflussung von Entzündungen, S. 323-56.

Lüttgenau J, Ulbrich SE, Beindorff N, Honnens A, Herzog K, Bollwein H. Plasma progesterone concentrations in the mid-luteal phase are dependent on luteal size, but independent of luteal blood flow and gene expression in lactating dairy cows. *Animal Reproduction Science* 2011; 125: 20-9.

Marelli BE, Diaz PU, Salvetti NR, Rey F, Ortega HH. mRNA expression pattern of gonadotropin receptors in bovine follicular cysts. *Reproductive Biology* 2014; 14: 276-81.

Matteo M, Cicinelli E, Sciorsci RL, Grandone E, Cardo G, Colaizzo D, Rizzo A, Greco P. Expression and hormonal modulation of the thromboxane A₂ receptor gene in mammalian testicular arteries. *Fertility and Sterility* 2006; 85: 1276-80.

Milvae RA, Hansel W. Prostacyclin, prostaglandin-f2-alpha and progesterone production by bovine luteal cells during the estrous-cycle. *Biology of Reproduction* 1983; 29: 1063-8.

Miyamoto A, Shirasuna K, Wijayagunawardane MPB, Watanabe S, Hayashi M, Yamamoto D, Matsui M, Acosta TJ. Blood flow: A key regulatory component of corpus luteum function in the cow. *Domestic Animal Endocrinology* 2005; 29: 329-39.

Miyamoto A, Shirasuna K, Hayashi KG, Kamada D, Awashima C, Kaneko E, Acosta TJ, Matsui M. A potential use of color ultrasound as a tool for reproductive management: New observations using color ultrasound scanning that were not possible with imaging only in black and white. *Journal of Reproduction and Development* 2006; 52: 153-60.

Morrow DA, Roberts SJ, McEntee K, Gray HG. Postpartum ovarian activity and uterine involution in dairy cattle. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1966; 149: 173-190.

Mutlag AM, Wang X, Yang Z, Meng J, Wang X, Zhang J, Qin Z, Wang G, Li J. Study on matrix metalloproteinase 1 and 2 gene expression and NO in dairy cows with ovarian cysts. *Animal Reproduction Science* 2015; 152: 1-7.

Nadaraja R, Hansel W. Hormonal changes associated with experimentally produced cystic ovaries in cow. *Journal of Reproduction and Fertility* 1976; 47: 203-8.

Nielsen AH, Hagemann A, Svenstrup B, Nielsen J, Poulsen K. Angiotensin-ii receptor density in bovine ovarian follicles relates to tissue renin and follicular size. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* 1994; 21: 463-9.

Noble KM, Tebble JE, Harvey D, Dobson H. Ultrasonography and hormone profiles of persistent ovarian follicles (cysts) induced with low doses of progesterone in cattle. *Journal of Reproduction and Fertility* 2000; 120: 361-6.

Odore R, Re G, Badino P, Donn A, Vigo D, Biolatti B, Girardi C. Modifications of receptor concentrations for adrenaline, steroid hormones, prostaglandin F-2 alpha and gonadotropins in hypophysis and ovary of dairy cows with ovarian cysts. *Pharmacological Research* 1999; 39: 297-304.

Okuda K, Korzekwa A, Shibaya M, Murakami S, Nishimura R, Tsubouchi M, Woclawek-Potocka I, Skarzynski DJ. Progesterone is a suppressor of apoptosis in bovine luteal cells'. *Biology and Reproduction* 2004; 71: 2065-71.

Ortega HH, Marelli BE, Rey F, Amweg AN, Diaz PU, Stangaferro ML, Salvetti NR. Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis. *Reproduction* 2015; 149: R251-R64.

Pall M, Friden BE, Brannstrom M. Induction of delayed follicular rupture in the human by the selective COX-2 inhibitor rofecoxib: a randomized double-blind study. *Human Reproduction* 2001; 16: 1323-8.

Papadopoulos V, Berkovich A, Krueger KE, Costa E, Guidotti A. Diazepam binding inhibitor and its processing products stimulate mitochondrial steroid biosynthesis via an interaction with mitochondrial benzodiazepine receptors. *Endocrinology* 1991; 129: 1481-8.

Peralta MB, Baravalle ME, Belotti EM, Stassi AF, Salvetti NR, Ortega HH, Rey F, Velazquez MML. Involvement of Matrix Metalloproteinases and their Inhibitors in Bovine Cystic Ovarian Disease. *Journal of Comparative Pathology* 2017; 156: 191-201.

Perez-Marin C. Formation of Corpora Lutea and Central Luteal Cavities and Their Relationship with Plasma Progesterone Levels and Other Metabolic Parameters in Dairy Cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 2009; 44: 384-9.

Peter AT. An update on cystic ovarian degeneration in cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 2004; 39: 1-7.

Peter AT, Levine H, Drost M, Bergfelt DR. Compilation of classical and contemporary terminology used to describe morphological aspects of ovarian dynamics in cattle. *Theriogenology* 2009; 71: 1343-57.

Peters MW, Pursley JR, Smith GW. Inhibition of intrafollicular PGE2 synthesis and ovulation following ultrasound-mediated intrafollicular injection of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor NS-398 in cattle. *Journal of Animal Science* 2004; 82: 1656-62.

Portela VM, Goncalves PBD, Buratini J, Price CA. A novel role for angiotensin II in the regulation of protease nexin-1 expression and secretion in bovine follicles. *Biology of Reproduction* 2006: 172-3.

Portela VM, Dirandeh E, Guerrero-Netro HM, Zamberlam G, Barreta MH, Goetten AF, Price CA. The Role of Fibroblast Growth Factor-18 in Follicular Atresia in Cattle. *Biology of Reproduction* 2015; 92: 1-8.

Price C, Estienne A (2018) The life and death of the dominant follicle. *Animal Reproduction* 2018; 15 (Suppl. 1): 680-90.

Pugliesi G, Khan FA, Hannan MA, Beg MA, Carvalho GR, Ginther OJ. Inhibition of prostaglandin biosynthesis during postluteolysis and effects on CL regression, prolactin, and ovulation in heifers. *Theriogenology* 2012; 78: 443-54.

Pursley JR, Mee MO, Wiltbank MC. Synchronization of ovulation in dairy-cows using

pgf(2-alpha), and gnrh. *Theriogenology* 1995; 44: 915-23.

Quirk SM, Cowan RG, Harman RM. The susceptibility of granulosa cells to apoptosis is influenced by oestradiol and the cell cycle. *Journal of Endocrinology* 2006; 189: 441-53.

Refsal KR, Jarrinmaldonado JH, Nachreiner RF. Endocrine profiles in cows with ovarian cysts experimentally induced by treatment with exogenous estradiol or adrenocorticotrophic hormone. *Theriogenology* 1987; 28: 871-89.

R Core team (2017), R: A Language and Environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>

Refsal KR, Jarrinmaldonado JH, Nachreiner RF. Basal and estradiol-induced release of gonadotropins in dairy-cows with naturally-occurring ovarian cysts. *Theriogenology* 1988; 30: 679-93.

Ribadu AY, Nakada K, Tanaka Y, Moriyoshi M, Zhang WC, Nakao T. Lack of LH response to exogenous estradiol in heifers with ACTH-induced ovarian follicular cysts. *Journal of Veterinary Medical Science* 1999; 61: 979-81.

Rizzo A, Minoia G, Trisolini C, Mutinati M, Spedicato M, Jirillo F, Sciorsci RL. Reactive oxygen species (ROS): involvement in bovine follicular cysts etiopathogenesis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 2009; 31: 631-5.

Roth Z, Biran D, Lavon Y, Dafni I, Yakobi S, Braw-Tal R. Endocrine milieu and developmental dynamics of ovarian cysts and persistent follicles in postpartum dairy cows. *Journal of Dairy Science* 2012; 95: 1729-37.

Rueda BR, Hendry IR, Hendry WJ, Stormshak F, Slayden OD, Davis JS. Decreased progesterone levels and progesterone receptor antagonists promote apoptotic cell death in bovine luteal cells. *Biology of Reproduction* 2000; 62: 269-76.

Sakumoto R, Hayashi KG, Takahashi T. Different expression of PGE synthase, PGF receptor, TNF, Fas and oxytocin in the bovine corpus luteum of the estrous cycle and pregnancy. *Reproductive Biology* 2014; 14: 115-21.

Salveti NR, Acosta JC, Gimeno EJ, Muller LA, Mazzini RA, Taboada AF, Ortega HH. Estrogen receptors alpha and beta and progesterone receptors in normal bovine ovarian follicles and cystic ovarian disease. *Veterinary Pathology* 2007; 44: 373-8.

Salveti NR, Stangaferro ML, Palomar MM, Alfaro NS, Rey F, Gimeno EJ, Ortega HH. Cell proliferation and survival mechanisms underlying the abnormal persistence of follicular cysts in bovines with cystic ovarian disease induced by ACTH. *Animal Reproduction Science* 2010; 122: 98-110.

Savio JD, Boland MP, Roche JF. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in postpartum dairy-cows. *Journal of Reproduction and Fertility* 1990; 88: 581-91.

Schauser KH, Nielsen AH, Winther H, Dantzer V, Poulsen K. Localization of the renin-angiotensin system in the bovine ovary: Cyclic variation of the angiotensin II receptor expression. *Biology of Reproduction* 2001; 65: 1672-80.

Senger PL (2012) Pathways to pregnancy and parturition, 3. ed. edn. *Current Conceptions*, Pullman, Washington, Chapter 8 Reproductive Cyclicity-The Follicular Phase, 160-79, Chapter 9 Reproductive Cyclicity_-The Luteal Phase, 180-201.

Shafteel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK. COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Molecular Brain Research* 2003; 119: 213-5.

Short RE, Randel RD, Staigmiller RB, Bellows RA. Factors affecting estrogen-induced lh-release in the cow. *Biology of Reproduction* 1979; 21: 683-9.

Silvia WJ, Hatler TB, Nugent AM, da Fonseca LFL. Ovarian follicular cysts in dairy cows: An abnormality in folliculogenesis. *Domestic Animal Endocrinology* 2002; 23: 167-77.

Sirois J, Fortune JE. Ovarian follicular dynamics during the estrous-cycle in heifers monitored by real-time ultrasonography. *Biology of Reproduction* 1988; 39: 308-17.

Sirois J. Induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by human chorionic-gonadotropin in bovine preovulatory follicles in-vivo. *Endocrinology* 1994; 135: 841-8.

Sirois J, Sayasith K, Brown KA, Stock AE, Bouchard N, Dore M. Cyclooxygenase-2 and its role in ovulation: a 2004 account. *Human Reproduction Update* 2004; 10: 373-85.

Skarzynski DJ, Piotrowska-Tomala KK, Lukasik K, Galvao A, Farberov S, Zalman Y, Meidan R. Growth and regression in bovine corpora lutea: regulation by local survival and death pathways. *Reproduction in Domestic Animals* 2013; 48 Suppl 1: 25-37.

Smith CJ, Zhang Y, Koboldt CM, Muhammad J, Zweifel BS, Shaffer A, Talley JJ, Masferrer JL, Seibert K, Isakson PC. Pharmacological analysis of cyclooxygenase-1 in inflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998; 95: 13313-8.

Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM. Cyclooxygenases: Structural, cellular, and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry* 2000; 69: 145-82.

Stichtenoth DO, Marhauer V, Tsikas D, Gutzki FM, Frolich JC. Effects of specific COX-2-inhibition on renin release and renal and systemic prostanoid synthesis in healthy

volunteers. *Kidney International* 2005; 68: 2197-207.

Stock AE, Fortune JE. Ovarian follicular dominance in cattle - relationship between prolonged growth of the ovulatory follicle and endocrine parameters. *Endocrinology* 1993; 132: 1108-14.

Studer E. Palpation of genital-tract for prediction of estrus in cow. *Veterinary Medicine & Small Animal Clinician* 1975; 70: 1337-41.

Tanabe T, Tohnai N. Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins & Other Lipid Mediators* 2002; 68-9: 95-114.

Todoroki J, Kaneko H. Formation of follicular cysts in cattle and therapeutic effects of controlled internal drug release. *Journal of Reproduction and Development* 2006; 52: 1-11.

Vane JRS, Botting JD (1998) Selective COX-2 inhibitors : pharmacology, clinical effects and therapeutic potential; proceedings of a conference held on March 20-21, 1997, in Cannes, France.

Vanholder T, Leroy JL, Dewulf J, Duchateau L, Coryn M, de Kruif A, Opsomer G. Hormonal and metabolic profiles of high-yielding dairy cows prior to ovarian cyst formation or first ovulation post partum. *Reproduction in Domestic Animals* 2005; 40: 460-7.

Vanholder T, Opsomer G, de Kruif A. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. *Reprod Nutrition Development* 2006; 46: 105-19.

Vernunft A, Weitzel JM, Viergutz T. Corpus luteum development and its morphology after aspiration of a preovulatory follicle is related to size and steroid content of the follicle in dairy cows. *Veterinarni Medicina* 2013; 58: 221-9.

Webb R, Gutierrez CG, Gong JG, Campbell BK. Dynamics and aetiology of ovarian follicular cysts in post-partum dairy cattle. *Reproduction in Domestic Animals* 1998; 33: 285-8.

Webb R, Campbell BK, Garverick HA, Gong JG, Gutierrez CG, Armstrong DG. Molecular mechanisms regulating follicular recruitment and selection. *Journal of Reproduction and Fertility* 1999: 33-48.

Weems CW, Weems YS, Randel RD. Prostaglandins and reproduction in female farm animals. *Veterinary Journal* 2006; 171: 206-28.

Weitzel JM, Vernunft A, Kruger B, Plinski C, Viergutz T. LOX-1 Regulates Estrogenesis via Intracellular Calcium Release from Bovine Granulosa Cells. *Cytometry Part A* 2014;

85A: 88-93.

Whitmore HL, Casida LE, Ginther J. corpus-luteum removal and steroid treatment of heifers in 4 consecutive estrous cycles - effects on frequency of cystic ovaries and expression of estrus. *American Journal of Veterinary Research* 1972; 33: 519-24.

Whitmore HL, Tyler WJ, Casida LE. Incidence of cystic ovaries in holstein-friesian cows. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 1974; 165: 693-4.

Wiltbank JN, Rowden WW, Ingalls JE. Effects of various forms and levels of estrogens alone or in combinations with gonadotrophins on estrous cycle of beef heifers. *Journal of Animal Science* 1961; 20: 341-46.

Wiltbank MC. Cell-types and hormonal mechanisms associated with mid-cycle corpus-luteum function. *Journal of Animal Science* 1994; 72: 1873-83.

Wiltbank MC, Gümen A, Sartori R. Physiological classification of anovulatory conditions in cattle. *Theriogenology* 2002; 57: 21-52.

Wu YL, Wiltbank MC. Transcriptional regulation of the cyclooxygenase-2 gene changes from protein kinase (PK) A- to PKC-dependence after luteinization of granulosa cells. *Biology of Reproduction* 2002; 66: 1505-14.

Yorifuji M, Sawaji Y, Endo K, Kosaka T, Yamamoto K. Limited efficacy of COX-2 inhibitors on nerve growth factor and metalloproteinases expressions in human synovial fibroblasts. *Journal of Orthopaedic Science* 2016; 21: 381-8.

Yoshimura Y, Karube M, Koyama N, Shiokawa S, Nanno T, Nakamura Y. Angiotensin-ii directly induces follicle rupture and oocyte maturation in the rabbit. *Febs Letters* 1992; 307: 305-8.

Yoshioka K, Iwamura S, Kamomae H. Ultrasonic observations on the turnover of ovarian follicular cysts and associated changes of plasma LH, FSH, progesterone and oestradiol-17 beta in cows. *Research in Veterinary Science* 1996; 61: 240-4.

Yuan W, Bao B, Garverick HA, Youngquist RS, Lucy MC. Follicular dominance in cattle is associated with divergent patterns of ovarian gene expression for insulin-like growth factor (IGF)-I, IGF-II, and IGF binding protein-2 in dominant and subordinate follicles. *Domestic Animal Endocrinology* 1998; 15: 55-63.

Zerbe H, Harxhi E, Bienek A, Boos A. New diagnostic and therapeutic aspects of ovarian cysts in cattle. *Praktische Tierarzt* 1999; 80: 63-68.

Zerbe H, Petzl W. Cystic Ovar follicle (ZOF) of the cortex - A Update. *Praktische Tierarzt* 2007; 88: 1009-15.

Zoldag L, Vetesi F, Solti L, Molnar L. Comparative endocrinologic and morphological-studies of the cyclic corpus-luteum and follicular-luteinic cyst in cattle. Magyar Allatorvosok Lapja 1986; 41: 343-7.

IX. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Joachim Weitzel für die Überlassung dieses interessanten und praxisrelevanten Themas bedanken, sowie für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der guten, unkomplizierten Betreuung.

Herrn Univ.-Prof. Dr. Holm Zerbe möchte ich für seine Bereitschaft danken, meine extern angefertigte Promotion an der tierärztlichen Fakultät in München zu vertreten. Zudem möchte ich ihm für das Einbringen vieler hilfreicher und nützlicher Ideen bei der Erstellung dieser Arbeit danken.

In besonderem Maße möchte ich mich bei meinem Betreuer Dr. Andreas Vernunft bedanken, ohne ihn wäre die Realisierung dieser Arbeit für mich undenkbar gewesen. Ich danke dir für deine unermüdliche Geduld und deinen unerschöpflichen Einsatz!

Auch möchte ich mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen am FBN bedanken, die mir immer eine enorme Hilfsbereitschaft entgegengebracht und meine Doktorandenzeit zu etwas Besonderem gemacht haben. Danke an die immer hoch motivierte Besetzung unseres deutsch-italienischen Büros: Ihr habt die Welt der Wissenschaft bunter gemacht! Danke an Volker Röttgen, der mich beim Schreiben der Publikation maßgeblich unterstützt hat, all meine lappschen Sätze richtig interpretieren konnte und immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte. Danke an Veronika Tesch, die mir bei all meinen Arbeiten in der Rinderanlage geholfen und eine Grundversorgung mit Lakritzbonbons sichergestellt hat. Danke an Carolin Ludwig, die mich durch sämtliche Höhen und Tiefen sowohl wissenschaftlicher, als auch unwissenschaftlicher Thematiken begleitet hat.

Mein Dank gilt ebenso meiner Familie: Ihr habt mich jederzeit bedingungslos unterstützt, trotz manch illustrier Lebensphasen und mich auch in schwierigen Abschnitten immer wieder erfolgreich motiviert, weiter zu machen.

Auch möchte ich mich im Besonderen bei meinem weltbesten Freundeskreis bedanken. Trotz der zum Teil weiten Entfernungen wart Ihr immer für mich da, habt euch geduldig sämtliche Probleme angehört und mich auch in jeder noch so schwierigen Situation aufgefangen! Danke!